

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Frühzeitige Detektion von
Eutergesundheitsstörungen durch die Beschreibung
der Zellgrößenverhältnisse mittels einer
modifizierten Coulter-Counter-Methode**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum agriculturalarum (Dr. rer. agr.)

Lebenswissenschaftliche Fakultät

M. Sc. Sabrina Elsholz

Dekan: Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. habil. Reiner Brunsch

2. Prof. Dr. habil. Sandra Rose-Meierhöfer

3. Prof. Dr. Dirk Hinrichs

Datum der Einreichung: 15.02.2016

Datum der Promotion: 31.08.2016

Kurzfassung

Ziel der Arbeit war es, die Eignung des Coulter Counters für das Eutergesundheitsmonitoring zu untersuchen. Hierfür wurde, als Voraussetzung für den Einsatz des Coulter Counters in der prozessnahen Milchuntersuchung, eine Probenaufbereitungsmethode entwickelt. Diese ermöglicht es durch Überkopfzentrifugation mit hoher Geschwindigkeit ($1600 \times g$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 Minuten) die Proben binnen weniger Minuten so aufzubereiten, dass sie im Coulter Counter gemessen werden können. Die Überkopfzentrifugation garantiert dabei die Messbarkeit der Zellen sowohl des Zellpellets auch des Überstands ohne Fettrückstände in der Probe.

Es wurde festgestellt, dass sich die Partikelgrößenverteilung im Falle einer Mastitis deutlich verändert. Basierend auf den Partikelgrößenverteilungsdaten konnten mittels eines Trainingsdatensatzes Algorithmen zur Differenzierung des Gesundheitsstatus entwickelt werden. Die Zuordnung des Gesundheitsstatus konnte im Testdatensatz mit einer Spezifität von 100 % für den Status „gesund“, 96,9 % für den Status „subklinisch erkrankt“ und 91,2 % für den Status „erkrankt“ nachgewiesen werden.

Schlagworte: Mastitis, Eutergesundheit, Coulter Counter, Zellzählung, Zentrifugation, Partikelgrößenverteilung

Abstract

The aim of this study was, to examine the suitability of the Coulter Counter for udder health monitoring. Therefore a sample preparation method was developed as precondition for using the Coulter Counter for online Monitoring. The preparation method allows to prepare the samples within a few minutes to make them measurable in the Coulter Counter. For this a high speed centrifugation in overhead position is used ($1600 \times g$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 min). This guarantees to measure the cells of the cell pellet as well as of the supernatant, without any fat particles in the sample.

It could be shown that the particle size distribution changes during a mastitis. Based on the data of the particle size distribution algorithms to differentiate the udder health status could be developed. The classification of the udder health status could be done with a specificity of 100 % for the status healthy, 96.6 % for the status subclinical infected and 91.2 % for the status clinical infected.

Keywords: Mastitis, udder health, Coulter Counter, cell counting, centrifugation, particle size distribution

Meiner Mama

Danksagung

Zu allererst möchte ich der Hans-Böckler Stiftung und ihren Beschäftigten danken. Ohne die Förderung durch das Stipendium wäre mir diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dabei danke ich auch für die immer freundliche und hilfsbereite Kommunikation.

Prof. Dr. Reiner Brunsch danke ich für die Überlassung des Themas und die stets konstruktiven und voranbringenden fachlichen Gespräche. Frau Prof. Dr. Sandra Rose-Meierhöfer danke ich für die Betreuung sowohl fachlicher Art, als auch bei meiner beruflichen Entwicklung. Ich hätte mir keine bessere Chefin wünschen können. Auch danke ich den Kolleginnen aus dem Labor der Abteilung 6, sowie Frau Dr.-Ing. Antje Fröhling, die mich bei der Einarbeitung und Arbeit dort unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen und Kolleginnen der Abteilung 5. Diese haben mir durch ihre Hilfsbereitschaft sowie Ihre freundliche und aufgeschlossene Art meine Arbeitstage erleichtert. Besonderer Dank gilt hierbei Christian Ammon und Jonas Nekat für ihre tatkräftige Unterstützung.

Zudem danke ich meinen Freunden, die mich immer bestärkt und unterstützt haben, im Besonderen meinen Freundinnen Alex, Anke, Anja, Corinna, Hannah, Kerstin und Steffi, der Familie Rinné und insbesondere Malin, bei denen ich ein zweites Zuhause gefunden habe- „tack för allt“, sowie meinen Büro-Mitbewohnerinnen Marianna Schmidt und Susanne Demba, ohne die so mancher Tag weniger schön gewesen wäre.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie meinen Omas, meinem Opa und ganz besonders meinen Eltern. Sie haben mich auf meinem Weg begleitet und mich uneingeschränkt bei allen meinen Entscheidungen unterstützt. Ohne euch hätte ich meinen Weg so nicht gehen können, ihr habt mich zu dem gemacht, was ich heute bin!

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	XI
Verzeichnis der Abbildungen.....	XIII
Verzeichnis der Tabellen.....	XIII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Die Somatischen Zellen der Milch.....	3
2.1.1 Lymphozyten.....	4
2.1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten	5
2.1.3 Makrophagen.....	5
2.1.4 Epithelzellen.....	6
2.2 Bedeutungen somatischer Zellen in der Milch.....	7
2.2.1 Bedeutung in der Tiergesundheit	7
2.2.2 Bedeutung in der Milchproduktion und in der Milchverarbeitung	8
2.3 Detektionsmöglichkeiten somatischer Zellen	10
2.3.1 Mikroskopie	10
2.3.2 Fluoreszenzoptische Zählung.....	10
2.3.3 Coulter Counter	11
2.4 Beeinflussung des SCC und DSCC durch die Probenaufbereitung.....	11
2.5 Ursachen für Änderungen der somatischen Zellen in der Milch.....	14
2.5.1 Einfluss des Eutergesundheitsstatus auf die somatischen Zellen der Milch...	14
2.5.2 Einfluss des Laktationsstadiums und der Laktation auf den DSCC.....	20
2.5.3 Einfluss der Milchfraktion auf die somatischen Zellen	21
2.5.4 Einfluss des Melkens auf die somatischen Zellen in der Milch	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Tiere	23
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	23
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung	27
3.2.2 Entwicklung der Messmethode mittels Coulter Counter	31
3.2.2.1 Bestimmung des Messbereichs zur Zellzahlbestimmung im Coulter Counter	31

3.2.2.2 Vergleich der entwickelten Aufbereitungsmethode mit der Methode nach IDF Standard	33
3.2.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung....	34
3.2.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen	34
3.2.3.2 Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter	35
3.2.3.3 Unterscheidung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren	36
3.2.3.4 Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Mastitis	38
4 Ergebnisse	40
4.1 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung	40
4.2 Messmethode zur Bestimmung des SCC im Coulter Counter	44
4.2.1 Bestimmung des Messbereichs zur Zellzahlbestimmung im Coulter Counter	44
4.2.2 Vergleich der entwickelten Aufbereitungsmethode mit der Methode nach IDF-Standard	46
4.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung.....	48
4.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen	48
4.3.2 Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter	52
4.3.3 Ermittlung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren .	59
4.3.4 Partikelgrößenverteilung während einer Mastitis	64
5 Diskussion	74
5.1 Bedeutung der Probenaufbereitung	74
5.2 Bestimmung des SCC im Coulter Counter	77
5.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung.....	79
5.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen	79
5.3.2 Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter	81
5.3.3 Unterscheidung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren	84
5.3.4 Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Mastitis	86
6 Schlussfolgerungen	88
7 Zusammenfassung	90
7. Summary	91
8. Literaturverzeichnis.....	92
9. Anhang	98

Verzeichnis der Abkürzungen

AMS	Automatisches Melksystem
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation)
CNS	Koagulase-negative Staphylokokken (Coagulase-negative Staphylococcus)
DSCC	Differenzierte Somatische Zellzahl (Differential Somatic Cell Count)
DVG	Deutsche veterinärmedizinische Gesellschaft
E. coli	Escherichia coli
F	Fettfraktion nach der Zentrifugation
g	Erdbeschleunigungskonstante
KI	Konfidenzintervall
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
LSM	least square means (Methode der kleinsten Quadrate)
NaCl	Natriumchlorid
P	Zellpelletfraktion nach der Zentrifugation
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
QVG	Quotient des vorderen kritischen Partikelgrößenbereichs und der Gesamtpartikelzahl
QMG	Quotient des mittleren kritischen Partikelgrößenbereichs und der Gesamtpartikelzahl
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S. aureus	Staphylococcus aureus
SCC	somatische Zellzahl (Somatic Cell Count)
S. dysgalactiae	Streptococcus dysgalactiae
Ü	Fraktion des wässrigen Überstands nach der Zentrifugation
ÜP	Gemisch der Pelletfraktion und des wässrigen Überstands nach der Zentrifugation
ZM	Zentrifugationsmethode

Verzeichnis der Einheiten

%	Prozent
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
g	Gramm
$\times g$	Multiplikator der Erdbeschleunigungskonstante

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Aufbau der Überkopfzentrifugation mit dem 2 ml Reaktionsgefäß für die Milchprobe; Einzelteile.....	30
Abbildung 2:	Aufbau der Überkopfzentrifugation mit dem 2 ml Reaktionsgefäß für die Milchprobe; zusammengesetzt.....	30
Abbildung 3:	Milchprobe mit Fett im Coulter Counter gemessen	42
Abbildung 4:	Partikelgrößenverteilung bei unvollständiger Fettabtrennung.....	43
Abbildung 8:	Partikelverteilung nach vollständiger Fettabtrennung	43
Abbildung 6:	Vergleich des SCC ermittelt mittels Fossomatic™ 5000 und Coulter Counter (für die Partikelgrößen von 5,5 µm bis 30 µm)	45
Abbildung 7:	Vergleich des SCC ermittelt mittels Fossomatic™ 5000 Fossomatic und Coulter Counter (für die Partikelgrößen von 5,5 µm bis 30 µm)	45
Abbildung 8:	Vergleich des SCC nach der Aufbereitung nach IDF bzw. nach Zentrifugation (ZM).....	46
Abbildung 9:	Differenz der logarithmierten SCC Werte der beiden Coulter Counter Methoden zur Referenzmethode aufgetragen gegen die logarithmierten Mittelwerte der Methoden.....	47
Abbildung 10:	Differenz der logarithmierten SCC Werte der beiden Coulter Counter Methoden zur Referenzmethode aufgetragen gegen die logarithmierten Mittelwerte der Methoden, für Zellgehalte bis 300.000 Zellen/ml.....	48
Abbildung 11:	Vergleich der Zellzahlen von Anfangsgemelk (x-Achse) und Gesamtgemelk ermittelt mittels Fossomatic™ 5000	49
Abbildung 12:	Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 667 (gesund)	50
Abbildung 13:	Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 657 (gesund)	50
Abbildung 14:	Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 415 (subklinisch erkrankt).....	51
Abbildung 15:	Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 692 (subklinisch erkrankt).....	51
Abbildung 16:	Milch einer an Mastitis erkrankten Kuh, Gemelk des kranken Euterviertels (blau), Gemelk der drei gesunden Viertel (grün), Gesamtgemelk (rot).....	52
Abbildung 17:	Graphen der Partikelgrößenverteilung verschiedener Milchproben aus dem Coulter Counter Programm ohne Anpassung der Achsen	53

Abbildung 18:	Graphen der Partikelgrößenverteilung verschiedener aus dem Coulter Counter nach Anpassung der Achsen	53
Abbildung 19:	Partikelgrößenverteilung drei verschiedener Milchproben.....	54
Abbildung 20:	Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener gesunder Tiere	55
Abbildung 21:	Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener subklinisch erkrankter Kühe	56
Abbildung 22:	Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener klinisch an Mastitis erkrankter Kühe	56
Abbildung 23:	Grafische Darstellung der drei kritischen Bereiche mit den Kurven drei verschiedener Kühe unterschiedlichen Gesundheitszustand (rot- gesund, grün subklinisch erkrankt, blau- krank)	58
Abbildung 24:	Schritt 1 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, kritischer Wert für kranke Tiere bei einem Wert von $\geq 0,37$ für den Quotienten zwischen dem mittleren Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QMG).....	60
Abbildung 25:	Schritt 2 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, anhand des Quotienten zwischen dem mittleren Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QMG) aufgetragen über dem dekadischen Logarithmus der Gesamtpartikelzahl ..	61
Abbildung 26:	Schritt 4 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, anhand des Quotienten zwischen dem vorderen Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QVG) aufgetragen über dem dekadischen Logarithmus der Gesamtpartikelzahl ..	62
Abbildung 27:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 1 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)	65
Abbildung 28:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 2 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau) ..	65
Abbildung 29:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 3 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)	66
Abbildung 30:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 4 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau).....	66
Abbildung 31:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 5 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)	66
Abbildung 32:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 6 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)	67
Abbildung 33:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 7 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)	67

Abbildung 34:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 8 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau).....	67
Abbildung 35:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 9 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)	68
Abbildung 36:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 10 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)	68
Abbildung 37:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 11 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)	68
Abbildung 38:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 12 des Tieres 723 (blau)	69
Abbildung 39:	Partikelgrößenverteilung der Melkung 13 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)	69
Abbildung 40:	Partikelgrößenverteilung von Kuh 393 bei vier aufeinanderfolgenden Melkungen mit unterschiedlichem SCC (Melkung 1: rot, Melkung 2: grün, Melkung 3: blau, Melkung4: schwarz)	71
Abbildung 41:	Partikelgrößenverteilung von Kuh 455 bei vier aufeinanderfolgenden Melkungen mit unterschiedlichem SCC	72

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Maximal- und Minimalangaben über die Verteilung der Zelltypen in der Literatur	4
Tabelle 2:	Zentrifugationsprotokolle verschiedener Autoren zur Milchaufbereitung für die SCC Analyse	13
Tabelle 3:	DSCC angegeben von verschiedenen Autoren, die nach Gesundheitsstatus oder SCC Klasse unterschieden haben (Teil 1).....	18
Tabelle 4:	DSCC angegeben von verschiedenen Autoren, die nach Gesundheitsstatus oder SCC Klasse unterschieden haben (Teil 2).....	19
Tabelle 5:	Eingesetzte Laborgeräte	24
Tabelle 6:	Für die Untersuchungen genutztes Labormaterial	24
Tabelle 7:	Für die Untersuchungen benutzte Chemikalien	24
Tabelle 8:	Übersicht der Proben für die unterschiedlichen Fragestellungen.....	27
Tabelle 9:	Wahrheitsmatrix für den Status "gesund"	38
Tabelle 10:	Least squares means (LSM) mit den jeweiligen 95% Konfidenzintervallen (KI) des SCC für die verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Fraktionen	40
Tabelle 11:	Least squares means (LMS) des Fettgehaltes in % abhängig von Zentrifugationsgeschwindigkeit und Milchfraktion.....	41
Tabelle 12:	Signifikanzen für die Unterscheidung der verschiedenen Gesundheitsstati anhand der ausgewählten Partikelgrößenbereiche	57
Tabelle 13:	Kennzahlen für die Doppelbestimmungen der Partikelzahlen im Coulter Counter	59
Tabelle 14:	Proben des Trainingsdatensatzes mit ihrem tatsächlichen Zugehörigkeit zu einem Gesundheitsstatus, zugeordnet zur Einteilung nach der entwickelten Prozedur.....	63
Tabelle 15:	Kennzahlen bei der Erkennung des Eutergesundheitsstatus für den Trainingsdatensatz.....	63
Tabelle 16:	Proben des Testdatensatzes mit ihrer tatsächlichen Zugehörigkeit zu einem Gesundheitsstatus, zugeordnet zur Einteilung nach der entwickelten Prozedur	64
Tabelle 17:	Kennzahlen bei der Erkennung des Eutergesundheitsstatus für den Testdatensatz	64
Tabelle 18:	Zellzahlen der Tiere 455, 221 und 723 im Krankheitsverlauf mittels Fossomatic™ 5000 bestimmt	70

Tabelle 19:	Kennzahlen Partikelgrößenverteilung von Kuh 393	71
Tabelle 20:	Kennzahlen Partikelgrößenverteilung von Kuh 455	73
Tabelle 21:	Beurteilung zytologischer und mikrobiologischer Milch-Befunde nach DVG	83

1 Einleitung

Eutererkrankungen zählen noch immer zu den wichtigsten Abgangsursachen in der Milchviehhaltung. Zusätzlich zu den vorzeitigen Abgängen bedeuten Eutererkrankungen für den Betrieb wirtschaftliche Verluste durch Behandlungskosten, Mehrarbeit, nicht ablieferbare Milch sowie Milchmengenverluste in der fortlaufenden Laktation. Eine möglichst frühe und sensitive Detektion von Eutergesundheitsstörungen ermöglicht es, die finanziellen Verluste sowie das Leid für die Tiere zu reduzieren.

Zur Reduktion dieser Verluste ist eine Früherkennung von zentraler Bedeutung. Diese kann aufgrund der physiologischen Reaktion des Euters auf die Infektion mit euterpathogenen Mikroorganismen erfolgen. Als wichtiger Teil der körpereigenen Abwehr strömen zur Abwehr der eingedrungenen Mikroorganismen Leukozyten in die Milchdrüse. Die Bestimmung der somatischen Zellzahl in der Milch gilt deshalb allgemein als guter Indikator für den Eutergesundheitszustand. Die Krankheitserkennung beruht hierbei nicht auf der Infektion des Euters selbst, sondern auf der Immunreaktion des Organismus der Kuh. Umso wichtiger ist es, die Immunreaktion so früh wie möglich zu detektieren. Zur Erfassung der Zellzahl existieren schnell arbeitende Routinemethoden. Aufgrund der spezifischen Aufgaben der verschiedenen Arten von Leukozyten in der Immunabwehr des Euters verändert sich deren Verteilung während einer Mastitis. In verschiedenen Studien konnten Gesundheitsprobleme des Euters schneller erkannt werden, wenn statt der Zählung der Gesamtzellzahl eine Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen vorgenommen wurde. Die dafür vorhandenen Methoden sind jedoch aufwändig und im täglichen praktischen Gebrauch nicht realisierbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, welche die Vorteile der schnellen Zellzahlbestimmung und die Informationskraft der aufwändigen Zelldifferenzierung verbindet. Hierfür wurde der Coulter Counter genutzt. Dieser wurde in vergangenen Jahrzehnten neben anderen Methoden zur Zellzählung genutzt, wurde aber aus den Standards entfernt, vermutlich aufgrund der erforderlichen aufwändigen Probenvorbereitung.

Es ist möglich, eine praktikable Aufbereitungsmethode zu entwickeln, die es gewährleistet, die meiste Zellen für die Coulter-Counter-Analyse messbar zu machen.

Durch den Einsatz des Coulter Counters ist es möglich, zur Zellzahl auch die Partikelgrößenverteilung zu bestimmen. Dies bedeutet einen Gewinn an Informationen zum SCC, ohne dabei den Aufwand der Zelldifferenzierung betreiben zu müssen.

Durch eine Euterentzündung verändern sich die Anteile der Zellgrößen. Aufgrund dessen ist es möglich, mit Hilfe angepasster Auswertalgorithmen, die Zellgrößenverteilung zur Klassifizierung der Milch in Milch von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren zu nutzen.

2 Kenntnisstand

2.1 Die Somatischen Zellen der Milch

Die Gruppe der somatischen Zellen der Milch umfasst verschiedene Arten körpereigener Zellen, welche sich in der Milch wiederfinden. Körperfremde Zellen, wie beispielsweise Bakterien, zählen hingegen nicht zu der genannten Gruppe. Den Hauptanteil unter den somatischen Zellen bilden die Leukozyten, welche sich wiederum in Lymphozyten, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Makrophagen einteilen lassen. Ein Anteil an somatischen Zellen in der Milch ist physiologisch und gehört zur Immunabwehr des Euters. So wird im Allgemeinen eine Anzahl bis zu 100.000 Zellen/ml im einzelnen Euterviertel als gesund angesehen (DVG, 2002).

Der Gehalt an somatischen Zellen wird angegeben als SCC (Somatic Cell Count). Die Angabe erfolgt hierbei als Anzahl der somatischen - also körpereigenen - Zellen pro ml Milch. Der SCC ist ein weltweit anerkanntes Merkmal zur Einschätzung der Eutergesundheit sowie der Milchgüte. Der DSCC (Differential Somatic Cell Count) ist nicht einheitlich definiert. Generell gibt er für jeden der Zelltypen an, welchen prozentualen Anteil der jeweilige Zelltyp am SCC hat. Problematisch hierbei ist die Bezugsgröße, da sich manche Autoren auf den zuvor ermittelten SCC beziehen (Kurzhaus et al., 1985; Leitner et al., 2000a; Leitner et al., 2000b; Riollot et al., 2001), andere hingegen auf die Anzahl der insgesamt gezählten Zellen (Merle et al., 2007; Pilla et al., 2012; Schwarz et al., 2011a; Schwarz et al., 2011b). Auch werden nicht von allen Autoren dieselben Zelltypen gezählt, was vor allem dann problematisch ist, wenn die Bezugsgröße ein unabhängig von der Zelldifferenzierung ermittelter SCC ist, da so möglicherweise Werte verfälscht werden.

Üblicherweise wird in Makrophagen, PMNs, Lymphozyten und Epithelzellen unterschieden. Viele Autoren differenzieren lediglich die Typen der Leukozyten oder definieren noch weitere Zelltypen, wie Epithelzellen oder Zellpartikel (Koess und Hamann, 2008; Leitner et al., 2000b; Olde Riekerink et al., 2007). Die stark voneinander abweichenden Zahlen in der Literatur sind zum Teil auf die unterschiedliche Auswahl der Zelltypen, sowie die nicht einheitliche Bezugsgröße zurückzuführen. Tabelle 1 zeigt die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte der einzelnen Zelltypen in einem gesunden Euter, welche in der Literatur zu finden sind.

Tabelle 1: Maximal- und Minimalangaben über die Verteilung der Zelltypen in der Literatur

Zelltyp	Anteil in % Minimalwert	Autor	Anteil in % Maximalwert	Autor
<i>PMN</i>	0-11 %	(Lee et al., 1980)	70,5 %	(Dulin et al., 1982)
<i>Makrophagen</i>	13 %	(Leitner et al., 2000b)	46,3 %	(Merle et al., 2007)
<i>Lymphozyten</i>	0,4%	(Dulin et al., 1982)	72,7 %	(Rivas et al., 2006)
<i>Epithelzellen</i>	0 – 7 %	(Lee et al., 1980)	45 %	(Leitner et al., 2000b)

2.1.1 Lymphozyten

Die Lymphozyten werden in T- und B-Lymphozyten untergliedert. Morphologisch unterscheiden sich B- und T-Zellen nicht. Lymphozyten sind relativ kleine, runde Zellen (Lerche et al., 1966). Für Lymphozyten werden in der Literatur Größenspannen von 4 µm bis 8 µm (Mielke, 1994), 5 – 10 µm (Liebich, 2010) und 6 - 9 µm (Lerche et al., 1966) angegeben. Große Lymphozyten können eine Größe von bis zu 25 µm erreichen. Sie machen im Blut mit etwa 3 % einen geringen Anteil aus (Liebich, 2010).

Lymphozyten gehören zur spezifischen Immunabwehr des Körpers. Sie sind in der Lage, durch Membranrezeptoren Antigene zu erkennen. Die Einteilung erfolgt in die Untergruppen der B- und T-Lymphozyten (Sordillo und Streicher, 2002). T-Lymphozyten produzieren Zytokine, welche immunregulatorisch wirken, oder lysieren alte und nicht mehr intakte Wirtszellen. B-Lymphozyten hingegen haben membrangebundene Antikörper, welche die Antigenpräsentation erleichtern. Andere Typen der B-Lymphozyten synthetisieren Antikörper gegen erkannte Antigene (Sordillo und Streicher, 2002).

2.1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) gehören zur angeborenen Immunantwort des Körpers und stellen die erste zelluläre Abwehrreaktion auf eindringende Pathogene dar (Paape et al., 2003). Die Größenangaben für bovine PMNs variieren zwischen 4 – 9 µm (Mielke, 1994), 9 – 12 µm (Lerche et al., 1966), 10 - 12 µm (Liebich, 2010), 9 - 13 µm (Kraft und Dürr, 2005). Ihre äußere Gestalt ist rund. Charakteristisch ist der mehrfach segmentierte Zellkern (Paape et al., 2003). Je nach Reifezustand des Granulozyten ist die Segmentierung unterschiedlich stark ausgeprägt (Liebich, 2010). Zudem besitzen sie eine gefaltete Oberfläche für die Phagozytose von Bakterien, zytoplasmatische Granula sowie verschiedene Oberflächenrezeptoren (Paape et al., 2003).

Die Aufgabe der PMNs in der Immunabwehr des Euters sind die Phagozytose und die intrazelluläre Abtötung der Bakterien sowie die Sekretion von antibakteriellen Faktoren (Sordillo und Streicher, 2002). Bei einer bakteriellen Infektion werden vor allem die Neutrophilen sehr schnell und in großer Anzahl zum Infektionsherd rekrutiert (Clough und Roth, 1998).

PMNs verändern sich in der Struktur, wenn sie vom Blut in die Milch übertreten. PMNs nehmen in der Milch Fettpartikel und Casein auf und bilden dabei große, membranumschlossene Vakuolen aus. Die Abschnürung dieser Membranen führt zu einer Reduktion der Pseudopoden. Auch die zytoplasmatische Granula der PMNs ist im Vergleich zu der im Blut verringert. Alles in allem ist dadurch die bakterizide und phagozytotische Aktivität der PMNs in Milch verringert. Die Immunabwehr der Milchdrüse ist daher abhängig von der Menge einströmender PMNs aus dem Blut (Paape et al., 2003).

2.1.3 Makrophagen

Makrophagen gehören zum Monozyten-Makrophagen-System. Die Monozyten sind die im Blut zirkulierenden Vorläufer der Makrophagen. Erst im Zielgewebe wandeln sich Monozyten in Makrophagen um (Weiss und Wardrop, 2010). Die Makrophagen sind mit einer Größe von 8 µm bis 30 µm (Mielke, 1994) die größten Zellen unter den Leukozyten.

Wie auch die PMNs sind Makrophagen Fresszellen und vernichten durch Phagozytose und die anschließende intrazelluläre Abtötung ins Euter eingedrungene Bakterien (Sordillo et al., 1997). Des Weiteren sind sie für die Antigenpräsentation verantwortlich (Sordillo und Streicher, 2002). Makrophagen akkumulieren sich vor allem in Gewebe, in welchem ein chronisches Entzündungsgeschehen vorliegt (Clough und Roth, 1998).

In der Immunabwehr des Euters ist die Sekretion von Substanzen, welche den Einstrom und die bakterizide Aktivität von PMNs erhöhen, eine wichtige Funktion der Makrophagen (Sordillo und Streicher, 2002). Sie initiieren durch das Freisetzen chemischer Signalstoffe den Einstrom von PMNs und damit die erste Immunreaktion der Milchdrüse auf eingedrungene Bakterien (Paape et al., 2002). Zudem phagozytieren sie nicht nur Bakterien. Es konnten in ihrem Plasma auch Reste apoptotischer PMNs nachgewiesen werden. So minimieren sie die Gewebeschädigung des Euters durch die giftigen, antibakteriellen Absonderungen (reaktive Sauerstoffverbindungen und Granulaenzyme) der PMNs (Sladek et al., 2005).

2.1.4 Epithelzellen

Die Epithelzellen im Euter haben je nach Lokalisation verschiedene Funktionen. Die Epithelzellen in den Alveolen des Euterdrüsengewebes sind die milchbildenden Zellen, sie sezernieren die Milchbestandteile in das Drüsengewebe. Des Weiteren werden alle Milchgänge, die Zysternen sowie der Strichkanal, von Epithelzellen ausgekleidet. Die Zellen werden im Laufe der Laktation ständig erneuert, wobei die alten Zellen abgeschilfert werden (Boutinaud und Jammes, 2002). Epithelzellen haben eine Größe von 10 bis 30 µm für Drüsenepithelzellen und bis zu 55 µm im Falle von Plattenepithelzellen (Lerche et al., 1966).

Die Epithelzellen sind die physische Barriere zwischen Euter und dem restlichen Organismus der Kuh (Reith, 2006). Die Epithelzellen des Eutergewebes regulieren den Transfer von löslichen Substanzen und Makromolekülen, sowie das Eindringen der Leukozyten aus dem Blut ins das Euter. Auch sind sie an der Regulation des Gefäßdrucks sowie des Blutflusses in der Homöostase sowie während einer Infektion beteiligt (Ryman et al., 2015). Durch eine Infektion des Euters werden zum Beispiel verschiedene Interleukine produziert (Reith, 2006), die Stärke der epithelialen Immunantwort ist dabei abhängig vom Erregertyp. Zusammen mit den Makrophagen initiieren die Epithelzellen durch das Freisetzen von chemischen Signalstoffen den Einstrom von PMNs und damit die erste Immunreaktion der Milchdrüse

(Paape et al., 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass Erregertoxine zu einer Apoptose der Epithelzellen führen. Liu et al. (2014) wiesen nach, dass Staphylococcus enterotoxin H ein Absterben der bovinen Euterepithelzellen induziert. Demnach führt eine Infektion mit Staphylococcus aureus zu einem Verlust von Euterepithelzellen. Basierend auf der Tatsache, dass dies die milchbildenden Zellen sind, steht zu vermuten, dass die Apoptose dieser Zellen ein Grund für Milchmengenverluste während und vor allem auch nach einer abgeklungenen Mastitis ist.

Epithelzellen gelangen in die Milch, wenn diese vom Eutergewebe abgeschilfert werden oder absterben (Mielke, 1994). Die Epithelzellen in der Milch entstammen also in einem gewissen Maße dem natürlichen Erneuerungsprozess des Milchdrüsenepithels. Im Falle von Infektionen kommt es jedoch zu einem vermehrten Absterben der Epithelzellen. Dies resultiert aus der Gewebeschädigung, welche durch den Infektionsprozess und die Immunantwort hervorgerufen wird (Frost et al., 1982).

2.2 Bedeutungen somatischer Zellen in der Milch

2.2.1 Bedeutung in der Tiergesundheit

Die somatischen Zellen gelangen auf verschiedenen Wegen aus dem Körper der Kuh in die Milch. Die Leukozyten treten durch die Blut-Milch-Schranke aus dem Blut in die Milch über, während die Epithelzellen aus dem Eutergewebe selbst stammen (Mielke, 1994). Das Abschilfern der Epithelzellen ist bis zu einem gewissen Grad der natürliche Erneuerungsprozess des Gewebes. Im Falle von Infektionen kann es zum vermehrten Absterben vom Euterepithel aufgrund von Nekrosen und Verschorfung kommen (Frost et al., 1982).

Der Gehalt an somatischen Zellen, sowie der Anteil der jeweiligen Zelltypen, unterliegen gewissen Schwankungen. Dies sind zum Teil physiologische Ursachen, wie zum Beispiel eine Dynamik im Laktationsverlauf, zum Teil aber auch pathologische Ursachen, wie beispielsweise eine Infektion des Euters. Die Eutergesundheit ist hierbei der gravierendste Einflussfaktor, da der größte Anteil der somatischen Zellen aus Leukozyten besteht und somit damit zentraler Teil der Immunabwehr der Kuh und des Euters ist. Bis zu einem gewissen Grad sind die Zellen in der Milch als prophylaktische Erregerabwehr vorhanden. Im Falle einer akuten Infektion des Euters mit euterpathogenen Mikroorganismen erfolgt die

Immunantwort der Kuh. Es strömen vermehrt Leukozyten aus dem Blut in das Euter. Dieser Zusammenhang ist die physiologische Begründung für die Indikatoreigenschaft des SCC für eine Mastitis.

In gesunden Eutern ist der Anteil an Makrophagen sehr hoch (Ostensson et al., 1988). Auch Lymphozyten kommen verstärkt vor (Schwarz et al., 2011a). Dringen Bakterien ins Euter ein, setzen das betroffene Eutergewebe sowie die Makrophagen als Reaktion auf Bakterientoxine oder Stoffwechselprodukte Entzündungsmediatoren frei. Diese bewirken den vermehrten Einstrom von PMNs ins Euter (Paape et al., 2002; Riollot et al., 2000). Bei abklingender Erkrankung strömen wieder vermehrt Makrophagen ins Euter, um Bakterien und apoptotische PMNs zu phagozytieren und somit das Eutergewebe vor weiterer Schädigung zu schützen (Sladek et al., 2005). Durch die Kenntnis des Ablaufs der Leukozytenreaktion auf Krankheitserreger bietet die Zelldifferenzierung eine Möglichkeit, detaillierte Informationen über eine entstehende Erkrankung sowie das Stadium der Erkrankung zu liefern.

2.2.2 Bedeutung in der Milchproduktion und in der Milchverarbeitung

Milch dient als wichtiges Nahrungsmittel und unterliegt demnach strengen hygienischen Standards. Auch der Gehalt an somatischen Zellen, welcher sich in der Rohmilch befinden darf, wenn diese vom Landwirt abgeliefert wird, ist gesetzlich geregelt. Die Milchgüteverordnung (2010) regelt sowohl die regelmäßige Kontrolle der Tankmilch u.a. auf somatische Zellen als auch die Kriterien für den Auszahlungspreis für den Milcherzeuger. Der Preis für die Güteklasse S wird dann gezahlt, wenn der SCC im geometrischen Mittel von drei Monaten einen Wert von 300.000 Zellen/ml nicht überschreitet. Zu Abschlägen im Milchpreis kommt es, wenn im selben Untersuchungsintervall ein Zellgehalt von 400.000 Zellen/ml überschritten wird.

Eine Mastitis bzw. ein erhöhter SCC ist mit einem Rückgang der Milchmenge korreliert (Brown et al., 1986; Detilleux et al., 2015; Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Meijering et al., 1978; Müller und Sauerwein, 2010), wobei der Milchmengenverlust vor allem bei hochleistenden Tieren stärker ausgeprägt ist (Hand et al., 2012). Eine Ursache für den Milchverlust sind die antibakteriellen Substanzen, die von den Leukozyten, vor allem den PMNs, abgesondert werden und nicht nur antibakteriell wirken, sondern auch das Eutergewebe schädigen. Die Fähigkeit des Gewebes zur Milchsekretion ist durch Infektionen

eingeschränkt (Akers und Nickerson, 2011). Dies ist sowohl für den Landwirt negativ, der mit jedem Liter weniger Milch weniger Einnahmen hat, als auch für die Molkereien, die auf die gelieferte Milch zur Weiterverarbeitung angewiesen sind. Bei Untersuchung des SCC in Verbindung mit der Milchmenge fanden Hagnestam-Nielsen et al. (2009) bei einem SCC von 500.000 Zellen/ml (ohne klinische Symptome) einen Rückgang der täglichen Milchmenge um 3 % bis 9 % bei erstlaktierenden Kühen und einen Rückgang von 4 % bis 18 % bei Tiere in höheren Laktationen. Ähnliche Schätzungen machen Hand et al. (2012), welche den Milchverlust in 24 h abhängig von der Laktation, dem SCC und dem Laktationsstadium, mit 1,44 % bis 11,58 % angeben. Sie geben an, dass der Milchmengenverlust mit zunehmendem SCC, Laktation und Laktationsstadium steigt. Es wurde von vielen Autoren geschlussfolgert, dass ein erhöhter Zellgehalt zu einem Rückgang der Milchmenge führt. Andere Autoren fanden jedoch einen Verdünnungseffekt bei Milchmengen ab 10-20 l. Sie schlussfolgerten daraus, dass der Milchmengenverlust, welcher mit dem Anstieg des SCC korreliert ist, oftmals überschätzt wurde (Green et al., 2006). Eine andere Studie konnte belegen, dass es bereits eine Melkzeit vor dem SCC-Anstieg zu einem Milchmengenverlust kam (Berglund et al., 2007). Diesen Effekt zwischen Milchmenge und SCC konnte von Koç und Kizilkaya (2009) sowie Müller und Sauerwein (2010) bestätigt werden.

In der milchverarbeitenden Industrie ist der SCC insofern von Bedeutung, dass er die Zusammensetzung der Milch, deren Verarbeitbarkeit, als auch die Produktqualität der Milchprodukte beeinflusst. Der Gehalt an Kasein sowie der Laktosegehalt sinken während einer Mastitis. Während der Anteil an freien Fettsäuren erhöht ist und der Gehalt an Immunglobulinen steigt (Auldist und Hubble, 1998). Gerade der erhöhte Gehalt an freien Fettsäuren beeinträchtigt die Qualität und Haltbarkeit der Rohmilch (Ma et al., 2000). Bei der Verarbeitung der Milch konnte festgestellt werden, dass es in pasteurisierter oder ultrahocherhitzter Milch mit einem hohen Gehalt an somatischen Zellen zu einer Fehlentwicklung von Geruch und Geschmack kommt (Le Maréchal et al., 2011). Auch bei der Weiterverarbeitung kann es bei Milch mit einem hohen SCC zu Problemen kommen. So konnte nachgewiesen werden, dass bei der Verarbeitung von Milch mit einem hohen SCC der Wassergehalt im Endprodukt Käse steigt. Zudem wird die Entwicklung von Fehlgerüchen gefördert, und die Gerinnungseigenschaften können beeinträchtigt werden (Le Maréchal et al., 2011). Bei fermentierten Milchprodukten wurden eine verlängerte Koagulationszeit sowie schlechtere organoleptische Eigenschaften festgestellt (Auldist und Hubble, 1998). Auch für Milchpulver aus Milch mit erhöhtem SCC konnten Veränderungen des Produkts wie eine

veränderte Hitzestabilität und eine verringerte Haltbarkeit nachgewiesen werden (Auldist und Hubble, 1998).

2.3 Detektionsmöglichkeiten somatischer Zellen

Es bieten sich verschiedene Möglichkeiten zur Detektion der somatischen Zellen in der Milch an. Grundsätzlich unterscheiden kann man zwischen direkten und indirekten Methoden. Bei Nutzung direkter Methoden werden die vorhandenen Zellen gezählt, indirekte Methoden lassen durch die Bestimmung korrelierter Parameter Rückschlüsse auf die Zellzahl zu. Direkte Methoden sind die Mikroskopie, die fluoreszenzoptische Zellzählung und der Coulter Counter. Zu den indirekten Methoden zählt beispielsweise der Schalmtest.

2.3.1 Mikroskopie

Die Mikroskopie gilt laut IDF-Standard (IDF, 2008) als Referenzmethode für die Bestimmung der Zellzahl. Die somatischen Zellen werden hierbei unter dem Mikroskop gezählt. Die Milchproben auf dem Objektträger werden hierzu mit Methylen-Blau angefärbt. Gezählt werden die Zellen auf einer definierten Fläche, wonach dann der Gehalt an Zellen in der Probe errechnet werden kann.

Die mikroskopische Zählung ist auch für die Differenzierung der Zellen geeignet. Hierbei stehen verschiedene Färbetechniken zur Verfügung, welche Kern, Plasma und Zellmembran unterschiedlich stark färben. Damit ist es möglich, die Zelltypen zu differenzieren. Verwendete Färbemethoden zur Zelldifferenzierung sind beispielsweise die Wright-Färbung (Dulin et al., 1982; Miller et al., 1991; Olde Riekerink et al., 2007), die May-Grünwald-Färbung (Pilla et al., 2012; Riollet et al., 2001) oder Toluidin-Blau (Koess und Hamann, 2008; Schröder und Hamann, 2005).

2.3.2 Fluoreszenzoptische Zählung

Die fluoreszenzoptische Methode ist die Routinemethode des IDF-Standards (IDF, 2006). Diese funktioniert nach dem Prinzip einer stark vereinfachten Durchflusszytometrie. Die Milch wird durch eine Kanüle angesaugt und mittels Ethidiumbromid angefärbt. Dieser Farbstoff färbt die DNS in den Zellkernen und ermöglicht damit eine Spezifizierung zwischen

Zellen und anderen Partikeln. Die Zellen werden vereinzelt und der in ihnen enthaltene Farbstoff durch einen Laserstrahl oder UV-Licht angeregt. Hierdurch wird pro angefärbter und angeregter Zelle ein Lichtimpuls ausgesendet. Dieser Lichtimpuls wird in ein elektrisches Signal umgewandelt. Hierdurch ist das Zählen der Zellen möglich (Krömker, 2007).

2.3.3 Coulter Counter

Im früheren IDF-Standard 148 (IDF, 1991) ist der Coulter Counter als Routinemethode zur Zellzählung genannt. In den nachfolgenden Standards (IDF, 2006, 2008) werden nur noch die Mikroskopie als Referenzmethode sowie die Fluoreszenzoptische Zählung als Routinemethode genannt.

Zur Messung im Coulter Counter wird die Milch mit einer leitfähigen Flüssigkeit verdünnt. Die Messvorrichtung besteht aus einer Kapillare mit definierter Öffnung. Innerhalb und außerhalb der Kapillare befindet sich je eine Elektrode. Zwischen den beiden Elektroden liegt eine Spannung an. Beim Durchtritt eines Partikels durch die Kapillare ändert sich der Widerstand. Die Anzahl der Widerstandsänderungen gibt die Anzahl der durch die Kapillare getretenen Partikel wieder (Krömker, 2007). Die Höhe der Widerstandsänderung lässt Rückschlüsse auf Größe und Oberflächenbeschaffenheit des Partikels zu.

2.4 Beeinflussung des SCC und DSCC durch die Probenaufbereitung

Die Zellzahlbestimmung mittels fluoreszenzoptischen Verfahren kann in der unbehandelten Rohmilch erfolgen. Für andere Bestimmungsmethoden der Zellzahl, wie dem Coulter Counter, und zur Zellspezifikation/Zelldifferenzierung ist oftmals eine Aufbereitung der Milchprobe vor der Zellanalyse nötig. So haben zum Beispiel die Fettpartikel eine ähnliche Größe wie die somatischen Zellen und überlagern bei der Messung im Coulter Counter diesen Bereich (Read Jr et al., 1967). Dadurch würde es ohne Behandlung der Probe zu verfälschten Ergebnissen kommen. Auch bei Messungen im Durchflusszytometer zur Zellspezifikation stört der Fettanteil in der Milch die Messungen und muss entfernt werden. Die Befreiung der Probe vom Fett kann entweder durch die Abtrennung mittels Zentrifugation erfolgen oder mit Hilfe von Tensiden wie beispielsweise Triton®-X 100 (IDF, 1991; Pearson et al., 1970), welche die Fettpartikelchen feinst emulgieren.

Verschiedene Aufbereitungsmethoden der Milchproben zur Messung der somatischen Zellen aber beeinflussen sowohl den Gesamtzellgehalt als auch die prozentuale Zusammensetzung der unterschiedlichen Zelltypen. Die Zentrifugation der Milch und das Verwerfen verschiedener Fraktionen führen zu einem Verlust von Zellen in der Probe. Nach der Zentrifugation zur Fettabtrennung konnten Anteile von somatischen Zellen nicht nur im Zellpellet, sondern auch im Überstand sowie der Fettschicht nachgewiesen werden (Dulin et al., 1982). Der dominierende Zelltyp in Überstand und der Fettschicht sind Makrophagen (Dulin et al., 1982). Schröder (2003) nimmt an, dass eine zunehmende Zentrifugationsintensität (10 min, $1400 \times g$, 10°C im Vergleich zu vier Zentrifugationsschritten mit $1000 \times g$, je für 15 Minuten) zu einem Verlust von Lymphozyten und einer Akkumulation von PMNs führt. Basierend auf diesem Ergebnis ist davon auszugehen, dass auch der Anteil der unterschiedlichen Zelltypen von der Aufbereitungsmethode und dem damit zusammenhängenden Verlust von Zellen in den verworfenen Fraktionen beeinflusst wird. Dieser Zellverlust aufgrund von Zentrifugation steigt mit zunehmender Lagerungsdauer der Probe (Baumert et al., 2009). So kann das Aufbewahren der Milchproben in Plastikbehältern den Anteil an messbaren Makrophagen reduzieren (Schröder und Hamann, 2005), da diese an Kunststoff adhäsieren.

Beachtet man diese Ergebnisse, so können die deutlich voneinander abweichenden Untersuchungsergebnisse verschiedener Studien einen Grund in der unterschiedlichen Probenaufbereitung haben. Genutzte Zentrifugationsprotokolle, die sich in der Literatur zur Zellzahlbestimmung mittels Coulter Counter oder Zelldifferenzierung finden lassen, variieren von $125 \times g$ (Pilla et al., 2012) bis zu einem Maximalwert von $14000 \times g$ (Fröhling et al., 2010). Auch die Angaben zur Zentrifugationsdauer, der Menge an zusätzlichen Substanzen, wie zum Beispiel phosphatgepufferter Salzlösung (PBS- phosphate buffered saline) oder die Anzahl an Waschschritten variieren stark. Tabelle 2 zeigt die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Aufbereitungsprotokolle für Milch, die als Probenaufbereitung für die Zelldifferenzierung oder Coulter Counter Messungen dienen.

Tabelle 2: Zentrifugationsprotokolle verschiedener Autoren zur Milchaufbereitung für die SCC Analyse

Autor	Anzahl Waschschrte	Menge Milch	Bei der Zentrifugation zugesetzte Substanzen	Zentrifugationsgeschwindigkeit	Zeit in min	Zentrifugationstemperatur	Genutzte Fraktion nach der Zentrifugation
(Leitner et al., 2000b)	1	10 ⁶ Zellen		230 × g	10	4 °C	Pellet
(Schröder und Hamann, 2005)	3	200 ml	PBS (200 ml)	1000 × g	15		Pellet
(Schwarz et al., 2011b)	1			200 × g	15	4 °C	Pellet
(Koess und Hamann, 2008)	1	200 ml	PBS (200 ml)	1000 × g	15		Pellet
(Pilla et al., 2013)	2	200 ml		250 × g	30	4 °C	Pellet
(Redelman et al., 1988)	0	1- 2 ml		1000 rpm	10	RT	Pellet
(Piepers et al., 2009)	4	25 ml	PBS (25 ml)	300 × g	10	4 °C	Pellet
(Stelwagen und Lacy-Hulbert, 1996)	0	10 ml		490 × g	15		nach McDonald
(Merle et al., 2007)	0			1500 × g	30	4°C	
(Pilla et al., 2012)	0	4 ml	PBS-EDTA (10 mL)	125 × g	15		Pellet
(Olde Riekerink et al., 2007)	1	200 ml	PBS (200ml)	1516 × g	10		Pellet und Überstand
(Miller et al., 1991)	1	1 ml	PBS (8 ml)	180 × g	10	5 °C	Pellet + 5 ml Überstand
(Dulin et al., 1982)	1	1 ml	PBS (8 ml)	180 × g	10	5 °C	Pellet + 0.5 ml Überstand
(Read Jr et al., 1967)	0	0,2 ml	0,85% NaCl (0,98 ml)	1020 × g	15	0-3°C	Pellet * 5ml liquid

* PBS – phosphate buffered saline; rpm – revolutions per minute; g - Erdbeschleunigungskonstante

Die Differenzierungsmethoden, die für die Ermittlung des DSCC in Milch genutzt werden, sind vielseitig. Verschiedene Autoren nutzen mikroskopische Verfahren zur Bestimmung der Zelltypen (Alhussien et al., 2015; Dulin et al., 1982; Koess und Hamann, 2008; Lun et al., 2007; Merle et al., 2007; Miller et al., 1991; Schröder und Hamann, 2005). Andere modifizieren diese Methode, indem sie Zytospinpräparate anfertigen (Dulin et al., 1982; Pilla et al., 2012; Redelman et al., 1988; Riollet et al., 2001), bei denen die Zellen aufgrund ihrer Größe auf dem Objektträger durch die Fliehkräfte etwas getrennt werden und somit leichter zu zählen sind. Wieder andere Autoren nutzen für die Zelldifferenzierung das Prinzip der Durchflusszytometrie (Blagitz et al., 2015b; Koess und Hamann, 2008; Leitner et al., 2000a; Leitner et al., 2003; Leitner et al., 2012; Leitner et al., 2000b; Lun et al., 2007; Pilla et al., 2013; Redelman et al., 1988; Schröder und Hamann, 2005; Schwarz et al., 2011b; Schwarz et al., 2013; Zoldan et al., 2014).

Für die Differenzierung der Zellen mittels des Prinzips der Durchflusszytometrie werden in den meisten Fällen Antikörper genutzt. Hierbei ist die Wahl der Antikörper von Bedeutung für das Ergebnis. Bei einem Vergleich von zwei Antikörperpaaren, welche alle gegen T-Zellen reaktiv sein sollen, zeigten sich signifikante Unterschiede. Es wurden zwei Antikörper mit einer Reaktivität gegen CD4 (CC8 - AbD Serotec und 3w-086CACT83A- Tierärztliche Hochschule Hannover) und zwei weitere mit einer Reaktivität gegen zwei verschiedene Strukturen von T-Lymphozyten (CC101 – AbD Serotec und GB21A – VMDR) verglichen. Hierbei konnte der Antikörper als signifikanter Effekt auf die Bindungsrate und in der Folge auch auf das Ergebnis nachgewiesen werden (Schröder, 2003).

2.5 Ursachen für Änderungen der somatischen Zellen in der Milch

2.5.1 Einfluss des Eutergesundheitsstatus auf die somatischen Zellen der Milch

Als Mastitis wird eine Entzündung des Euters bezeichnet. Ursache der Infektion ist das Eindringen von Mikroorganismen, zumeist Bakterien, in das Euter (Aitken et al., 2011; Sordillo et al., 1997). Definiert wird eine Mastitis durch das Vorhandensein von Erregern in Kombination mit einem SCC von über 100.000 Zellen/ml (DVG, 2012). Der erhöhte SCC ist nicht die Ursache für die Mastitis, sondern die physiologische Abwehrreaktion des Euters zur Bekämpfung der eingedrungenen Erreger (Kehrli Jr und Shuster, 1994).

In verschiedenen Studien konnte ein genereller Zusammenhang zwischen dem SCC und dem DSCC, unabhängig von einer Mastitis, nachgewiesen werden. Bei einer Gruppe von Tieren mit einem durchschnittlichen SCC von unter 12.000 Zellen/ml konnten Lymphozyten als dominanter Zelltyp nachgewiesen werden, während der Anteil von Makrophagen und PMNs gering war. Im Falle eines SCCs bis zu 100.000 Zellen/ml hingegen stellten Makrophagen den höchsten Anteil der somatischen Zellen und der Gehalt der PMNs stieg mit ansteigender Zellzahl (Sarıkaya et al., 2006). Eine signifikant positive Korrelation zwischen SCC und dem Anteil an PMNs konnten auch Schwarz et al. (2011b) nachweisen. Auch konnten sie eine negative Korrelation zwischen dem Anteil an Lymphozyten und dem SCC nachweisen. Eine Korrelation zwischen Makrophagen (%) und dem SCC fanden sie hingegen nicht.

Bei Untersuchungen zur Veränderung des DSCC infolge von Eutererkrankungen fanden Blackburn et al. (1955) einen Anteil an PMN von unter 45 % an der Gesamtzellzahl als Grenzwert für ein gesundes Euter. Sie zeigten, dass dieser Parameter präziser ist als ein geringer SCC, da er weitestgehend unabhängig vom Laktationsstadium ist. Auch andere Autoren konnten die Eignung des PMN-Anteils zur Detektion von Eutererkrankungen belegen. So konnte auch in Eutern mit einem SCC von unter 100.000 Zellen/ml ein erhöhter Anteil an PMNs verzeichnet werden. Dies lässt vermuten, dass in dem Euter eine beginnende Infektion vorhanden ist, bei welcher die Erreger noch vor Auftreten deutlicher Krankheitssymptome durch die vermehrt auftretenden PMNs eliminiert werden können (Schwarz et al., 2011a). Im Versuch konnte ein signifikanter Anstieg des Anteils an PMNs vier Stunden nach der Infusion von *Escherichia coli* ins Euter nachgewiesen werden. Als Bezugswert galt der Anteil an PMNs zwei Stunden vor der Infusion (Lun et al., 2007). Der Anstieg des Anteils an PMNs als Indikator für eine Euterentzündung wurde auch von weiteren Autoren belegt (Alhussien et al., 2015; Blagitz et al., 2015b; Merle et al., 2007; Pilla et al., 2012; Pillai et al., 2001; Rivas et al., 2001b; Sladek et al., 2005; Zoldan et al., 2014). Auch die Art der Pathogene, welche die Mastitis hervorrufen, beeinflusst das Zellbild der Milch. Leitner et al. (2000b) stellten in der Milch von Kühen mit einer chronischen Mastitis deutlich höhere Anteile an PMNs fest, auch wenn der SCC niedriger war als in der Milch von Kühen mit einer akuten Mastitis. Den Einfluss der Mastitisform auf den DSCC untersuchten auch Pilla et al. (2012). Sie fanden neben einem niedrigeren Anteil an PMNs in der Milch gesunder Kühe im Vergleich zu derer von Tieren, welche an einer Mastitis erkrankt waren,

auch die Möglichkeit zwischen Mastitisformen zu unterscheiden. So entdeckten sie bei einer latenten Mastitis einen signifikant geringeren Anteil PMNs als bei einer akuten Mastitis.

Als Effekt des überproportional starken Anstiegs an PMNs konnte zeitgleich mit diesem ein Abfall des Anteils an Lymphozyten festgestellt werden (Rivas et al., 2001b). Für den Anteil an PMNs konnte eine positive Korrelation zum SCC, für den Anteil an Lymphozyten eine negative nachgewiesen werden (Schwarz et al., 2011a). Alhussien et al. (2015) detektierten einen signifikanten Abfall sowohl von Lymphozyten, als auch von Makrophagen in der Milch subklinisch und klinisch erkrankter Kühe. Diese Aussagen decken sich mit der Aussage anderer Autoren, welche Lymphozyten als die vorherrschende Gruppe der Leukozyten in der Milch eines gesunden Euters nennen (Sladek et al., 2005). Mit einem Anteil von bis zu 92 % fanden Schwarz et al. (2011a) die Lymphozyten als häufigsten Zelltyp in gesunden Eutervierteln. Der Ansatz, den Anteil der Lymphozyten als Indikator für die Eutergesundheit zu sehen, wird gestützt durch Pilla et al. (2012), welche einen signifikant höheren Anteil an Lymphozyten in der Milch von gesunden Kühen fanden, als in der von mastitiskranken Tieren. Zudem konnten sie einen höheren Anteil der Lymphozyten in der Milch von latent infizierten, im Vergleich zu akut infizierten Tieren nachweisen. Durch die Bildung des Quotienten aus T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, detektiert als CD2/CD21-Index, konnte eine Korrelation zwischen Index und dem bakteriologischen Status nachgewiesen werden. Milch gesunder Euterviertel wies einen Index größer zehn auf, während in der Milch infizierter Viertel ein Index kleiner zehn detektiert wurde (Schwarz et al., 2013).

Im Gegensatz zu den meisten Studien, in welchen lediglich die Leukozyten spezifiziert wurden, bezogen sich Leitner et al. (2000b) und Wagner et al. (2009) auch auf die Epithelzellen. So benennt Leitner et al. (2000b) die Epithelzellen mit einem Anteil von 45 % als dominierenden Zelltyp in der Milch eines gesunden Euters.

In einer Studie von Merle et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Zellzusammensetzung in einem infizierten Euterviertel sich verändert, sondern dass auch die benachbarten, gesunden Viertel Veränderungen zeigen. So ist der mittlere SCC in Eutervierteln, die insgesamt unter dem kritischen Wert von 100.000 Zellen/ml liegen, höher, sofern ein Viertel einen SCC von über 400.000 Zellen/ml aufweist. Bei Untersuchungen des DSCC konnte zudem festgestellt werden, dass sich der DSCC in den Vierteln verändert, die neben einem moderat infizierten Viertel (100.000 Zellen/ml bis 400.000 Zellen/ml) liegen.

Diese Veränderung war für PMNs bereits ab einem SCC von unter 50.000 Zellen/ml in den gesunden Vierteln signifikant. Für den Anteil der Makrophagen konnten signifikante Unterschiede zwischen gesunden Eutern mit vier gesunden Vierteln gegenüber den gesunden Vierteln mit einem SCC von unter 50.000 Zellen/ml, die neben einem akut infizierten Euter liegen, festgestellt werden (Merle et al., 2007). Auch Blagitz et al. (2015a) konnten eine Beeinflussung der benachbarten Viertel durch ein krankes Viertel nachweisen. Während der SCC, die Anteile und die Vitalität von PMNs unabhängig vom Gesundheitsstatus der benachbarten Viertel war, konnte ein höherer Gehalt an B Zellen sowie eine höhere Expression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs in Nachbarvierteln von infizierten Vierteln nachgewiesen werden. Beide Studien widersprechen der Annahme, dass die Euterviertel gänzlich unabhängig voneinander sind.

Auch wenn die gravierendsten und für den Milchviehhalter relevanten Änderungen des DSCC die Euterinfektion als Ursache haben, so konnten auch Verletzungen der Zitze oder des Euters als Ursache für einen erhöhten Anteil an PMNs in der Milch nachgewiesen werden (Redelman et al., 1988).

Die Tabellen 3 und 4 geben einen Überblick über den DSCC, den verschiedene Autoren für Tiere mit unterschiedlichen Gesundheitsstadien oder SCC Klassen ermittelt haben.

Tabelle 3: DSCC angegeben von verschiedenen Autoren, die nach Gesundheitsstatus oder SCC Klasse unterschieden haben (Teil 1)

Autor	Probe	Status	SCC	PMN	Makrophagen	Lymphozyten	Epithelzellen
			*10 ³ /ml	%	%	%	%
(Alhussien et al., 2015)		gesund	2,55 ± 0,23 (logSCC)	18,5 ± 0,45	66,92 ± 0,68	14,58 ± 0,48	
		subklinische Mastitis	5,97 ± 0,28 (logSCC)	43,29 ± 0,58	45,13 ± 0,62	11,58 ± 0,36	
		klinisch	12,19 ± 0,56 (logSCC)	77,4 ± 0,58	17 ± 0,63	5,6 ± 0,25	
(Dulin et al., 1982)	Vorgemelk		< 0.70	70.5 / 65.0	28.9 / 34.1	0.4 / 0.8	
			0.70-1.50	62.6 / 60.2	36.4 / 38.4	0.4 / 0.9	
			> 1.50	65.4 / 62.4	33.2 / 36.9	0.4 / 0.4	
(Koess und Hamann, 2008)	Direkt nach Vorgemelk	gesund	0-50	30,5 ± 11,8	42,5 ± 11,1	25,9 ± 6,8	3,1 ± 1,2
		gesund	50-100	49,7 ± 16,4	35,3 ± 12,5	14,3 ± 5,1	0,6 ± 2,5
		gesund	100-200	57,7 ± 16,3	29,3 ± 13,7	12,1 ± 4,7	0,8 ± 3,1
		gesund	200-400	63,6 ± 16,9	25,0 ± 12,7	10,5 ± 5,0	0,3 ± 0,6
		infiziert	>400	66,8 ± 16,4	24,3 ± 16,2	8,6 ± 3,3	0,2 ± 0
(Leitner et al., 2000b)	Vorgemelk	akut infiziert (e.coli)	2752 ± 349	38 ± 6	4 ± 4	k.a.	3 ± 1
		akut infiziert (s.aureus)	1521 ± 262	36 ± 6	11 ± 2	k.a.	2 ± 3
		chronisch infiziert (s.aureus)	723 ± 221	42 ± 6	17 ± 1	k.a.	6 ± 3
		chronisch infiziert (KNS)	320 ± 74	49 ± 3	13 ± 2	k.a.	11 ± 3
		chronisch infiziert (s. dysgalactia)	809 ± 267	73 ± 6	5 ± 2	k.a.	7 ± 3
		gesund	67 ± 6	28 ± 3	13 ± 2	k.a.	45 ± 25

Tabelle 4: DSCC angegeben von verschiedenen Autoren, die nach Gesundheitsstatus oder SCC Klasse unterschieden haben (Teil 2)

Autor	Probe	Status	SCC	PMN	Makrophagen	Lymphozyten	Epithelzellen
			*10 ³ /ml	%	%	%	%
(Merle et al., 2007)	Hauptgemelk	gesund	4.31 (logSCC)	27,2	46,3	23,8	
		Moderate Mastitis	5.3 (logSCC)	58,7	31,2	9,6	
		Moderate Mastitis (gesundes Viertel)	4.39 (logSCC)	45,8	32,3	19,1	
		starke Mastitis	5.91 (logSCC)	81,9	12,9	4,8	
		starke Mastitis (leicht betroffene Viertel)	5.31 (logSCC)	71,7	19,5	8,5	
		starke Mastitis (gesundes Viertel)	4.55 (logSCC)	57,4	22,5	17,2	
(Mielke, 1994)	Vorgemelk	gesund	192	38 (12-61)	17 (3-27)	13 (4-31)	
		subklinische Mastitis	3753	62 (38-85)	10 (3-25)	5 (1-16)	
		klinische Mastitis	10805	61 (39-75)	11 (1-27)	8 (3-19)	
(Olde Riekerink et al., 2007)	Nach Vorgemelk	SCC < 200		22	66	0,3	
		SCC >200		38	54		
(Ostensson et al., 1988)	Hauptgemelk	SCC < 100	64 ± 5	12 ± 1	74 ± 3	14 ± 2	
		SCC 100-570	255 ± 30	22 ± 4	64 ± 5	14 ± 2	
(Pilla et al., 2012)	Vorgemelk	gesund	19,62 ± 2,5	42,2	23,3	34,5	
		infiziert		67,9	20,6	11,3	
(Wever und Emanuelson, 1989)		gesund	2.1 (log SCC) ± 0,3	36,0 ± 14,4	49,2 ± 15,7	14,8 ± 9,0	
		infiziert	2.4 (log SCC) ± 0,6	39,2 ± 16,0	44,8 ± 17,7	15,9 ± 10,4	

2.5.2 Einfluss des Laktationsstadiums und der Laktation auf den DSCC

Es gibt verschiedene Untersuchungen zu dem Einfluss sowohl der Laktation, als auch des Laktationsstadiums auf die somatischen Zellen in der Milch. Die Laktationsnummer bezeichnet die Anzahl der Laktationen, welche eine Kuh durchlaufen hat. Das Laktationsstadium bezeichnet den Zeitpunkt innerhalb einer Laktation.

Sowohl der SCC als auch der DSCC verändern sich im Laufe der Laktation. So fanden Kelly et al. (2000) einen Anstieg der Anzahl an PMNs im Laufe der Laktation. Pilla et al. (2012) fanden eine Korrelation zwischen den Melktagen und dem Anteil an Makrophagen in der Milch. Der Anteil der Lymphozyten war zu Beginn der Laktation höher als in der Mitte oder am Ende. Für den Anteil an Makrophagen und PMNs verhielt es sich andersherum, hier konnten in der Mitte und zum Ende der Laktation höhere Anteile gefunden werden (Dosogne et al., 2003). Pilla et al. (2013) fanden ansteigende Anteile von Lymphozyten und abfallende Anteile an Makrophagen mit steigendem Laktationstag und damit einen gegenteiligen Effekt als Dosogne et al. (2003). Allerdings konnten sie hier nur eine Tendenz und keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen. Im Vergleich der mittleren Laktation zur Spätlaktation wurden von anderen Autoren höhere Anteile von Lymphozyten und Monozyten in der Spätlaktation gefunden, während für die PMNs kein Zusammenhang nachzuweisen war (Leitner et al., 2012). Schwarz et al. (2011a) konnten dagegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Laktationsstadium und DSCC nachweisen.

Verschiedene Autoren untersuchten, ob es Veränderungen im DSCC gibt, wenn man unterschiedliche Laktationsnummern und Laktationsstadien vergleicht. Während Pilla et al. (2013) keinen Einfluss der Laktation auf den DSCC nachweisen konnten, so fanden Kelly et al. (2000) einen Anstieg der PMNs (%) von einer Laktation zur Nächsten. Dies konnten andere Autoren bestätigen, welche einen Anstieg des Anteils an PMNs im Verlauf der Laktation und zusätzlich einen Abfall des Anteils an Lymphozyten mit steigender Laktation fanden. Dieselbe Verschiebung der Zellanteile findet sich jedoch auch während einer Mastitis (Yu et al., 2011). Schon zuvor schlussfolgerten Wever und Emanuelson (1989) aus ihren Untersuchungen, dass die Laktation keinen Einfluss auf den DSCC hat, sofern der bakteriologische Status der Kuh berücksichtigt wird. Diese Entdeckung korrespondiert mit der Aussage von (Blackburn, 1966), der die Veränderung des SCC mit steigender Laktationsnummer untersucht hat. Unter der Voraussetzung, dass die Tiere in den

vergangenen Laktationen keine Mastitis durchlaufen haben, entsprach der SCC von Kühen in der ersten Laktation dem von Tieren in der vierten Laktation. Basierend auf dieser Erkenntnis schlussfolgerte er, dass der oft gezeigte Anstieg des SCC von einer Laktation zur Nächsten kein physiologischer Prozess ist. Der Anstieg des SCC ist vielmehr eine Folge vorheriger Eutererkrankungen. Mit Hilfe dieser Erkenntnis und den Ergebnissen von Wever und Emanuelson (1989) und Yu et al. (2011) lässt sich vermuten, dass auch die Veränderung des DSCC mit steigender Laktation eher bedingt ist durch eine vorhergegangene Erkrankung als durch einen physiologischen Prozess an sich.

2.5.3 Einfluss der Milchfraktion auf die somatischen Zellen

Grundsätzlich kann zwischen Alveolarmilch und Zisternenmilch unterschieden werden. Die Zisternenmilch macht hierbei normalerweise einen Anteil von unter 20 % der Gesamtmilchmenge im 12-Stunden Melkintervall aus (Pfeilsticker et al., 1996). Diese Fraktionen zeichnen sich durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Milchbestandteile aus. Der Fettgehalt steigt im Hauptgemelk im Vergleich zum Vorgemelk an. Die Protein- und Laktosegehalte hingegen fallen im Laufe des Melkprozesses (Nielsen et al., 2005).

Neben anderen Inhaltsstoffen unterscheidet sich auch der Gehalt an somatischen Zellen in den Milchfraktionen. Nielsen et al. (2005) fanden signifikante Unterschiede zwischen Vorgemelk und Gesamtgemelk bei einem 6 Stunden Melkintervall, bei einem 12 Stunden Melkintervall hingegen war der Unterschied nur bei Milch kranker Euterviertel signifikant nachweisbar. Bei einer Aufteilung in Milchproben mit SCC-Gehalten über 300.000 Zellen/ml, 50.000 – 300.000 Zellen/ml und unter 50.000 Zellen/ml konnte gezeigt werden, dass nur in der ersten Kategorie die Zellzahl im Vorgemelk signifikant höher war als im Gesamtgemelk, während bei den geringen Zellzahlen kein Unterschied festzustellen war. In extrem niedrigen Zellzahlbereichen von unter 50.000 Zellen/ml war der SCC im Vorgemelk sogar niedriger als im Hauptgemelk (Wellnitz et al., 2009). Auch Sarikaya und Bruckmaier (2006) zeigten, dass in SCC-Bereichen unter 100.000 Zellen/ml kein signifikanter Unterschied im SCC der Fraktionen Vorgemelk, Zisternenmilch, erste Alveolarmilch und restliche Alveolarmilch zu finden war. Bei einem SCC größer 100.000 Zellen/ml hingegen konnte ein signifikanter Abfall des SCC vom Vorgemelk zur Zisternenmilch und von der Zisternenmilch zur ersten Alveolarmilch festgestellt werden. Der SCC in der restlichen Alveolarmilch war im Vergleich

zur ersten Alveolarmilch höher und unterschied sich lediglich zum SCC des Vorgemelks signifikant (Sarikaya und Bruckmaier, 2006).

Ebenso unterscheiden sich die Anteile der einzelnen Zelltypen in den verschiedenen Milchfraktionen. So steigt der Anteil an PMNs im Laufe des Melkprozesses (Sarikaya et al., 2006; Winter et al., 2009). Dahingegen kann bei den Makrophagen ein Abfall im Laufe des Melkprozesses beobachtet werden (Sarikaya et al., 2006; Winter et al., 2009).

2.5.4 Einfluss des Melkens auf die somatischen Zellen in der Milch

Der Melkprozess sowie das Melkmanagement haben einen Einfluss auf den Gehalt und die Zusammensetzung der somatischen Zellen in der Milch. Auch ein Einfluss auf die Zellverteilung konnte nachgewiesen werden. So hat das Melkintervall einen Einfluss sowohl auf den Gesamtzellgehalt als auch auf die Zellzusammensetzung. So fanden Kelly et al. (1998) einen Anstieg des SCC beim einmaligen Melken und einen weiteren beim Melken alle zwei Tage im Vergleich zu einer Testgruppe, welche zweimal täglich gemolken wurde. Ebenfalls konnte ein steigender Anteil an PMNs bei größeren Melkintervallen festgestellt werden. Diese Untersuchungen konnten von Lakic et al. (2009) bestätigt werden, welche einen starken Anstieg an PMNs verzeichneten, nachdem das Melkintervall auf 24 Stunden verlängert wurde. Die mechanische Einwirkung des Melkens bewirkt einen Übertritt von PMNs vom Blut ins Euter. So konnte direkt nach dem Melken eine erhöhte Konzentration an PMNs in der Milch nachgewiesen werden (Paape et al., 1985). Auch der Einfluss des Betriebs konnte als signifikanter Effekt auf den DSCC festgestellt werden (Pilla et al., 2012). Allerdings wurden hier keine Angaben zu den konkreten Ursachen gemacht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiere

Für alle Versuche wurde, sofern nicht explizit anders genannt, das Gesamtgemelk genutzt. Die Milchproben wurden entweder mittels Tru-Test-Milkmetern genommen oder aus dem aufgefangenen Gesamtgemelk. Die Tru-Tester führen von jedem Pulszyklus ein Aliquot in ein Probengefäß und gewährleisten so eine repräsentative Probe des Gesamtgemelks. Bei Entnahme der Milch aus der Kanne wurde das gesamte Gemelk vor der Probenentnahme durchmischt, um eine Probenverfälschung durch die Entnahme der nicht homogenisierten Fraktionen zu vermeiden. Die Milch stammte von Tieren zweier unterschiedlicher Betriebe aus Berlin bzw. Brandenburg, Deutschland.

Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin

Rassen: Holstein Frisian
 Jersey
Haltung: Liegeboxenlaufstall mit Weidegang in den Sommermonaten
Melkanlage: Rohrmelkanlage

Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung e.V.; Groß Kreutz, Brandenburg

Rasse: Holstein Frisian
Haltung: Liegeboxenlaufstall
Melkanlage: Fischgrätenmelkstand
 Automatisches Melksystem (AMS): Lely A4 (Lely Holding; Maasslui,
 Niederlande)

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Folgende, in den Tabellen 5 bis 7 aufgeführte Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit genutzt.

Tabelle 5: Eingesetzte Laborgeräte

<i>CombiFoss™ bestehend aus</i> Fossomatic™ 5000 Type 71300 MilkoScan™ FT 6300	Foss GmbH, Rellingen, Deutschland Foss GmbH, Rellingen, Deutschland
Coulter Counter „Multisizer 3™“	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
50 µm Kapillare für Coulter Counter	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Tischzentrifuge „Centrifuge 5417 R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge „Centrifuge 5810 R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 6: Für die Untersuchungen genutztes Labormaterial

Pipetten, div. Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Accuvettes	Sarstedt AG Co, Nümbrecht, Deutschland
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzenfilter ø 0,22 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Tabelle 7: Für die Untersuchungen benutzte Chemikalien

Aqua dest.	
IsoFlow™ Sheath Fluid	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Eosine	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 35 %	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe, Deutschland

3.2 Methoden

Sämtliche Milchproben, welche untersucht wurden, wurden mit zwei verschiedenen Methoden gemessen, welche im Folgenden dargestellt werden. Dabei diente die fluoreszenzoptische Zellzählung, wie sie auch im IDF-Standard 148-2 (IDF, 2006) als Methode aufgeführt ist (vergleiche Kapitel 2.3.2), als Vergleichswert für die Messungen mittels Coulter Counter. Die praktische Durchführung beider Messungen wird hier, zum besseren Verständnis, vorangehend erläutert. Diese erläuterte Durchführung für das jeweilige Messprinzip gilt für alle Versuche, welche im Laufe dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Fluoreszenzoptische Zellzählung

Für die Untersuchungen nach dem Prinzip der fluoreszenzoptischen Zellzählung wurde eine Fossomatic™ 5000 Type 71300 (Foss GmbH, Rellingen, Deutschland) genutzt. Diese läuft in Kombination mit einem MilkoScan™ FT 6300 (Foss GmbH, Rellingen, Deutschland) als CombiFoss Anlage im Milchlabor des Leibniz Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.. Alle Milchproben, die im Laufe der Arbeit gemessen wurden, wurden mittels der Fossomatic™ 5000 auf ihren Gesamtzellgehalt untersucht. Dafür wurden die Proben in die zum Gerät gehörenden Probenfläschchen gefüllt und mittels Wasserbad auf eine Temperatur von 40°C erwärmt. Die Messtemperatur für die Proben ist im IDF-Standard 148-2 (IDF, 2006) vorgegeben. Vor der Messung wurden die Proben durch vorsichtiges Schwenken per Hand durchmischt und dann in die Messvorrichtung der Fossomatic™ 5000 Type 71300 (Foss GmbH, Rellingen, Deutschland) eingebracht. Die Angabe der Zellzahl erfolgte in 10³ Zellen/ml.

Infrarot basierte Messung

Die infrarotbasierten Messungen erfolgten mittels MilkoScan™ FT 6300 (Foss GmbH, Rellingen, Deutschland), welcher zur in 3.2.1 erwähnten CombiFoss™ Anlage gehört. Hiermit ist es möglich, Fettgehalt, Proteingehalt und Laktosegehalt der Milch zu bestimmen. Für einige Untersuchungen war eine Ermittlung des Fettgehalts erforderlich. Die Messung erfolgte parallel zur Messung des SCC mittels Fossomatic™ 5000 aus den jeweils selben Probenröhrchen wie der SCC. Die Ergebnisse werden in Prozent ausgegeben.

Coulter Counter Messung

Die Coulter Counter Messungen erfolgen im mikrobiologischen Labor des Leibniz Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. mittels des MultisizerTM 3 Coulter Counter® (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Nach der für den Coulter Counter erforderlichen Probenaufbereitung werden die Proben vermessen. Für die Messungen werden die Proben 1:200 mit einer Elektrolytlösung (IsoFlowTM Sheath Fluid, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) verdünnt. Hierzu werden 9,95 ml der Elektrolytlösung in ein spezielles Probengefäß, welches für den Coulter Counter geeignet ist, vorgelegt. Dazu werden 50 µl der jeweiligen Probe gegeben. Die Mischung wird vorsichtig vermengt, wobei zu heftige Bewegungen, die zu starker Luftblasenbildung führen, zu vermeiden sind. Eine starke Luftblasenbildung würde die Messungen beeinträchtigen. An jedem Messtag wird vor Messbeginn eine Probe des reinen Elektrolyts vermessen, welche dann als Hintergrundmessung dient. Die Hintergrundmessung wird in der Auswertung von den eigentlichen Messwerten abgezogen, um eventuelle Effekte der Verdünnungslösung zu eliminieren. Die Proben selbst werden in einer Dreifachbestimmung mit einer 50 µm Kapillare gemessen. Diese deckt einen Größenbereich der Partikel von 2 µm bis 30 µm ab.

Die vorbereiteten und homogenisierten Proben werden in einer Dreifachbestimmung gemessen, von welcher das Gerät selbst den Mittelwert bildet. Die Dateien können mit Hilfe des speziellen Programms angesehen und ausgewertet werden. Die Abbildungen können hierbei als Bild exportiert werden. Des Weiteren ist es möglich, die Daten jeder Messung in das Statistikprogramm SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) einzulesen und damit auszuwerten.

Zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen wurden zum Teil unterschiedliche Milchfraktionen oder Probenaufbereitungsprotokolle genutzt. Tabelle 8 stellt in der Übersicht die Anzahl der Proben, die verwendete Milchfraktion, die Zentrifugationsgeschwindigkeit, sowie die durchgeführte Analyse für jede Fragestellung dar. Die Probenaufbereitung mittels Zentrifugation erfolgte immer bei 4°C als Überkopfzentrifugation, wie in Kapitel 3.2.1 erläutert.

Tabelle 8: Übersicht der Proben für die unterschiedlichen Fragestellungen

Kapitel	Anzahl der Proben	Milchfraktion	Probenaufbereitung	Messungen
3.2.1 4.1	64	Tankmilch	Zentrifugation mit 400 × g 800 × g 1600 × g 3200 × g	CC Fossomatic MilcoScan
3.2.2.1 4.2.1	409	Gesamtgemelk von Einzeltieren ----- Mischproben aus Gesamtgemelken	Zentrifugation mit 1600 × g	CC Fossomatic
3.2.2.2 4.2.2	73	Gesamtgemelk	Zentrifugation mit 1600 × g ----- Probenaufbereitung nach IDF-Standard	CC Fossomatic
3.2.3.1 4.3.1	24 Tiere	Anfangsgemelk ----- Gesamtgemelk	Zentrifugation mit 1600 × g	CC Fossomatic
3.2.3.2 4.3.2	68	Gesamtgemelk	Zentrifugation mit 1600 × g	CC Fossomatic
3.2.3.3 4.3.3	Trainingsdaten 237 Proben ----- Testdaten 84 Proben	Gesamtgemelk	Zentrifugation mit 1600 × g	CC Fossomatic
3.2.3.4 4.3.4	406 Proben (15 Tiere)	Gesamtgemelk	Zentrifugation mit 1600 × g	CC Fossomatic

*CC: Coulter Counter

3.2.1 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

Um aussagekräftige Messungen der somatischen Zellen in der Milch mittels Coulter Counter durchzuführen, muss das Fett entfernt werden. Hierbei ist es wichtig, dass die Zellen in der

aufbereiteten Probe zurück bleiben und nicht mit dem abgetrennten Fett verloren gehen. Um diese Bedingungen zu gewährleisten, wurde die Trennung mit Hilfe von vier verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten untersucht. Zudem wurden alle Probenfraktionen auf ihren Zell- und Fettgehalt analysiert. Je Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Für die Mischproben wurden jeweils weitere vier Proben je Geschwindigkeit analysiert. Insgesamt wurden also 64 Proben unterschiedlicher Fraktionen und Zentrifugationsgeschwindigkeiten untersucht.

Alle Analysen wurden innerhalb von zwei Tagen durchgeführt, um eine Ergebnisverfälschung durch eine zu lange Lagerung der Milchproben auszuschließen. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei 4°C. Alle Zentrifugationen wurden bei einer Zentrifugentemperatur von 4°C durchgeführt. Wurden höhere Temperaturen gewählt so war das Fett von der Konsistenz her zu flüssig, um es vollständig abzutrennen. Es kam dadurch wieder zu einer Durchmischung von Fett und Überstand, was die Proben unbrauchbar machte. Die Zentrifugationsdauer betrug 15 Minuten in einer Zentrifuge mit Swing-out-Rotor. Es wurden vier verschiedene Geschwindigkeiten ($400 \times g$, $800 \times g$, $1.600 \times g$ und $3.200 \times g$) in je einer Vierfachbestimmung untersucht. Jede Probe enthielt 40 ml Tankmilch. Nach der Zentrifugation wurden die verschiedenen Fraktionen getrennt. Als Fraktionen ergaben sich hierbei: Fett, Überstand, Zellpellet und eine Mischung aus dem Überstand und dem darin resuspendierten Zellpellet. Nach der Aufteilung der Milchproben in die Fraktionen wurde jede Fraktion mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen von 40 ml aufgefüllt. Da die original Milchprobe aus 40 ml bestand und die Angabe der Geräte in Zellen pro ml erfolgt, wurde durch das Auffüllen auf das gleiche Volumen eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben untereinander gewährleistet.

Die Fraktionen Fett, Zellpellet, Überstand sowie Zellpellet inklusive Überstand wurden in der CombiFoss Anlage analysiert. Es wurden sowohl die Zellzahl als auch der Fettgehalt bestimmt. Alle Fraktionen mit Ausnahme des Fettes wurden mittels Coulter Counter® (Beckmann Coulter, Krefeld GmbH, Deutschland) gemessen. Die Fettfraktion wurde lediglich mittels Fossomatic™ 5000 und MilcoScan™ analysiert, da durch die Überlagerung der Größe der Fettpartikel mit der Größe der Zellen eine Messung im Coulter Counter keine Aussagekraft hat.

Getestet wurde der Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf den Fettgehalt sowie den Gehalt an somatischen Zellen in den verschiedenen Fraktionen. Für den Einfluss auf den Fettgehalt wurde das folgende lineare Modell genutzt:

$$y_{ijk} = \mu + f_i + s_j + (fs)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Hierbei ist y_{ijk} der gemessene Fettgehalt, μ der allgemeine Mittelwert des Fettgehalts, f_i der fixe Effekt der i -ten Fraktion ($i=1,\dots,4$), s_j der fixe Effekt der j -ten Zentrifugationsgeschwindigkeit ($j=1,\dots,4$), $(fs)_{ij}$ die Wechselwirkung zwischen der i -ten Stufe von f und der j -ten Stufe von s bei normalverteilten Residuen ε_{ijk} mit den Wiederholungen $k=1,\dots,4$. Als Nullhypothese, bei einem Signifikanzniveau von 5 % wurde angenommen, dass die Faktoren keinen Einfluss auf den Fettgehalt haben. Für die Analyse wurde die Prozedur MIXED des Softwarepakets SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) genutzt. Für die Faktoren, bei denen der F-Test signifikante Unterschiede zwischen den Faktorstufen fand, wurden die Faktorstufen paarweise auf Differenzen im mittleren Fettgehalt getestet. Um das globale Signifikanzniveau trotz multiplen Testens einzuhalten, wurde die SIMULATE-Option genutzt.

Der Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf den SCC Gehalt in den verschiedenen Fraktionen wurde mit einem verallgemeinerten linearen Modell getestet. Für die Daten wurde hierbei eine Poissonverteilung angenommen, so dass die log-Link Funktion genutzt wurde. Folgend war das lineare Modell identisch zu dem zuvor bei der Fettanalyse genutzten.

$$y_{ijk} = \mu + f_i + s_j + (fs)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} ist hierbei der gemessene SCC und μ der generelle Mittelwert des SCC. Für die Analyse wurde die GLIMMIX Prozedur mit derselben p-Wert Anpassung für multiple paarweise Vergleiche genutzt.

Da sich zeigte, dass das Abspateln des Milchfettes nach der Zentrifugation mitunter zu einer Resuspension desselben im Überstand führt, wurde eine spezielle Zentrifugation entwickelt. Die Reaktionsgefäße mit den Milchproben wurden über Kopf zentrifugiert, so dass sich die Schicht aus dem leichteren Fett nach der Zentrifugation im unteren Bereich des Röhrchens

befindet. Der darüber liegende Überstand kann bei dieser Methode dann abgegossen werden, das Zellpellet mittels Pipette aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes resuspendiert werden.

Da die Konstruktion der Zentrifugen in Kombination mit den Röhrchen es nicht zulässt, diese verkehrt herum in die Zentrifuge zu stellen, wurde eine Konstruktion für die Überkopfzentrifugation entwickelt. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen, wie die 2 ml Reaktionsgefäße mit dem Deckel nach unten in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen fixiert werden. Diese Röhrchen wiederum können dann, wie vorgesehen, mit dem Deckel nach oben in die Zentrifuge eingebracht werden.



Abbildung 1: Aufbau der Überkopfzentrifugation mit dem 2 ml Reaktionsgefäß für die Milchprobe; Einzelteile



Abbildung 2: Aufbau der Überkopfzentrifugation mit dem 2 ml Reaktionsgefäß für die Milchprobe; zusammengesetzt

Nach der Zentrifugation wird das 2 ml Reaktionsgefäß aus dem Zentrifugenröhrchen und dem Styroporring entfernt. In der Folge kann die Fettabtrennung durch Abgießen des Überstandes ohne die Gefahr der Vermischung von Fett und Überstand durchgeführt werden. Neben der Praktikabilität dieser Methode zur Fettabtrennung wurden auch die Partikelgrößenverteilungen mit und ohne Überkopfzentrifugation betrachtet.

3.2.2 Entwicklung der Messmethode mittels Coulter Counter

3.2.2.1 Bestimmung des Messbereichs zur Zellzahlbestimmung im Coulter Counter

Da der Coulter Counter, anders als die FossomaticTM 5000, nicht explizit Zellen, welche einen Zellkern enthalten zählt, sondern Partikel ist eine Bestimmung des Grenzwertes nötig, ab dem Partikel zur Bestimmung des SCC erfasst werden sollen. Anhaltspunkte für die Wahl der Grenzwerte sind als erstes die Zellgrößenangaben aus der Literatur. Partikel, welche in der Größe unter den kleinsten Zellen liegen können keine Zellen sein und sollten demnach nicht mitgezählt werden. Zum zweiten, werden auch ab einem Größenbereich, welcher die kleinsten Zellen schon mit einschließt Partikel mit gezählt werden, die keine intakten Zellen sind, sondern beispielsweise Bruchstücke von Zellen. Diese werden aufgrund des fehlenden Zellkern von der FossomaticTM 5000 nicht als somatische Zellen erfasst. Um zu analysieren, welcher Partikelgrößenbereich zu Zählung genutzt werden sollte um die bestmögliche Übereinstimmung der Partikelzahl mit dem mittels FossomaticTM 5000 als Referenzwert bestimmten SCC zu erhalten, wurde der folgende Versuch durchgeführt.

Für die Ermittlung des idealen Messbereiches zur Bestimmung der Zellzahl und Messung der Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter wurden insgesamt 409 Proben unterschiedlichen Zellgehaltes analysiert. Es wurden Rohmilchproben mit verschiedenen Zellgehalten genommen. Aus diesen Proben wurden noch einmal Mischproben erstellt, um eine große Spektrum an Zellzahlen abzudecken. Die Probenvorbereitung erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Das heißt, Proben von je 2 ml Milch wurden mit $1.600 \times g$ bei $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für 15 Minuten und über Kopf. Das Fett und der Überstand wurden durch Abgießen des Überstands voneinander getrennt. Das Zellpellet wurde mittels Pipette im Überstand resuspendiert. Die Proben wurden wie unter 3.2 beschrieben für die Messung im MultisizerTM 3 Coulter Counter® (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) vorbereitet und gemessen.

Der von den unbehandelten Proben mittels FossomaticTM 5000 Typ 71300 (Foss GmbH, Rellingen, Deutschland) analysierte SCC wurde als Referenzwert für die statistische Analyse genutzt.

Die Daten des Coulter Counters wurden in die Statistiksoftware SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) eingelesen. Für jede der 409 Proben wurden die Partikelzahlen von einem unteren Grenzwert von 4,7 µm bis zu einem oberen Auswertebereich von 30 µm bis zu einem Bereich von 7,3 µm bis 30 µm ermittelt. Der obere Grenzwert blieb konstant bei 30 µm. Die Literaturangaben für die größten der somatischen Zellen, die Makrophagen, reichen bis maximal 30 µm. Demnach müssen größere Partikel nicht erfasst werden, da es sich hier nicht um Zellen handelt. Die 50 µm-Kapillare erfasst Partikel bis zu einer Größe von 30 µm und deckt damit den nötigen Größenbereich komplett ab. Der untere Grenzwert wurde in Schritten von 0,1 µm von 4,7 µm bis 7,3 µm variiert. Die Minimalwertangaben für somatische Zellen in der Literatur variieren zwischen 4 µm und 6 µm, je nach Quelle. Die Angaben zu Grenzwerten der Partikelzählung in der Literatur variieren zwischen 4,7 µm und 7,3 µm. Diese Angaben wurden als Grundlage für die folgende Untersuchung genutzt. Dies resultierte in 27 Partikelzahlen je Probe. Das Ergebnis für jede Probe und jeden Partikelgrößenbereich wurde logarithmiert (natürlicher Logarithmus). Der logarithmierte Wert wurde gewählt, um eine Normalverteilung zu erzielen, die die Voraussetzung für die nachfolgende statistische Auswertung ist.

Um den unteren Grenzwert zu bestimmen wurde ein linear gemischtes Modell genutzt. Ziel war hierbei die geringste Abweichung zwischen Partikelzahl und SCC (Fossomatic™ 5000). Die Gleichung des Modells lautete wie folgt:

$$y_{ij} = \mu + t_i + m_j + \varepsilon_{ij}$$

Hierbei ist y_{ij} der natürliche Logarithmus der Partikelzahl, μ der generelle Mittelwert der Partikelzahl, t_i der fixe Effekt des i -ten Grenzwerts, inklusive des mit der Fossomatic™ 5000 bestimmten Referenzwertes ($i=1, \dots, 28$), m_j als zufälliger Effekt der j -ten Milchprobe ($j=1, \dots, 409$), sowie ε_{ij} der unabhängige, normalverteilte Restfehler. Die Partikelzahlen ermittelt mit den verschiedenen unteren Grenzwerten, wurden mittels Dunnett's Test jeweils mit dem Referenzwert verglichen. Es wurde hierbei ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen. Von den Mittelwerten, die sich hiernach nicht signifikant von dem Referenzwert unterschieden, wurde als ideal derjenige angenommen, welcher die geringste Abweichung von null aufwies. Dieser Grenzwert wurde folgend als Grenzwert für die Partikelzählung mittels Coulter Counter genutzt.

3.2.2.2 Vergleich der entwickelten Aufbereitungsmethode mit der Methode nach IDF Standard

Die in 3.2.1 entwickelte Aufbereitungsmethode wurde, zur Überprüfung der Praktikabilität und der Ergebnislage, mit der Probenaufbereitung verglichen, welche im früheren IDF-Standard 148 (IDF, 1991) für die Coulter Counter Messung beschrieben wurde. Aus den insgesamt 73 Proben, die zuvor mit der FossomaticTM 5000 auf ihren Zellgehalt bestimmt wurden, wurde jeweils ein Aliquot für die entwickelte Aufbereitungsmethode mittels Zentrifugation (2 ml) abgenommen, sowie eines für die Zellzählung nach IDF-Standard (10 ml).

Die Probenaufbereitung mittels Zentrifugation erfolgte wie zuvor in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Für die Untersuchung nach IDF-Standard wurden 10 ml der Milchproben in 50 ml Probengefäße pipettiert. Die Aufbereitung erfolgte im Allgemeinen wie im IDF-Standard (IDF, 1991) beschrieben. Abweichungen zum IDF-Standard werden folgend erläutert. Es wurde nicht, wie beschrieben, eine 100 µm Kapillare genutzt, sondern eine 50 µm Kapillare. Da jedoch beide Kapillaren den Größenbereich der somatischen Zellen messen können, führte dies zu keinerlei Problemen, da die Literaturangaben für die maximale Größe der somatischen Zellen bei 30 µm (Mielke, 1994) liegen. Dieser Bereich wird sowohl von der 100 µm Kapillare als auch von der 50 µm Kapillare abgedeckt. Der Messbereich der 50 µm Kapillare ist lediglich im unteren Partikelgrößenbereich erweitert. Bei der im früheren IDF-Standard (1991) genannten Emulgator-Elektrolyt-Lösung zur Probenverdünnung wurde die dort beschriebene Elektrolytlösung durch eine andere Elektrolytlösung (IsoFlowTM Sheath Fluid, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) ersetzt, welche auch im Gerät enthalten ist. Das Gerät ist auf dieses Fließmittel geeicht, ein Austausch dessen würde die Messwerte verfälschen. Im IDF-Standard ist die Elektrolytlösung als Beispiel genannt und es ist auch nach diesem Standard zulässig eine andere Lösung zu nutzen. Das Probenvolumen an aufbereiteter Milch, das zur Messung im Coulter Counter eingesetzt wurde, betrug 50 µl anstatt der im Standard genannten 100 µl, welche in einem Gesamtvolumen von 10 ml Fließlösung vorhanden waren. Die Verdünnung zur Messung betrug demnach 1:200 statt 1:100. Der Grund hierfür lag bei einer Partikelkonzentration, welche deutlich über dem Optimum für das Gerät lag, sofern 100 µl Probe eingesetzt wurden. Die reduzierte Probenkonzentration führt zu einer Erhöhung der Messgenauigkeit. Der Anteil an Triton X-100, der für die Fettdispersion verantwortlich ist, wurde der verringerten Probenkonzentration

angepasst. Das Verhältnis von Probe zu Tensid entspricht damit dem in dem IDF Standard angegebenen.

Die Milchprobe wird mit 200 µl Fixierlösung fixiert und 18 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 50 µl der zuvor noch einmal durchmischten Probe entnommen und mit 9,95 ml der Emulgator-Elektrolytlösung verdünnt. Diese Lösung wird für 10 Minuten bei 80°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Hierbei werden die Fettpartikel feinstemulgiert, so dass deren Größe nicht mehr den Größenbereich der somatischen Zellen überlagert. Nach Erreichen der Zimmertemperatur wurden die Proben im Coulter Counter gemessen.

Es wurden die verschiedenen Methoden, Fossomatic™ 5000, Coulter Counter nach IDF sowie Coulter Counter mit Vorbereitung mittels des entwickelten Zentrifugationsprotokolls, miteinander verglichen. Die deskriptive Analyse erfolgte für die Vergleiche Referenzmethode versus IDF-Methode; Referenzmethode versus eigene Methode, sowie für die IDF-Methode versus eigene Methode. Als Grenzwerte für die Partikelzählung wurden für beide Verfahren, die den Coulter Counter zur Zellzählung nutzen, der Bereich zwischen 5,5 µm und 30 µm genutzt. Es wurden jeweils die Differenzen zwischen zwei Methoden verglichen.

3.2.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung

3.2.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen

Um die Partikelgrößenverteilung zu interpretieren und aus ihr Hinweise zum Gesundheitszustand des Tieres ableiten zu können, sind die weiteren Faktoren von Bedeutung, welche Einfluss auf die Partikelgrößen haben. Um einen Eindruck zu gewinnen, inwieweit die Art der Probennahme die Partikelgrößenverteilung beeinflusst, wurden die Zellzahlen sowie die Partikelverteilungen von Anfangsgemelk und Gesamtgemelk verglichen. Als Anfangsgemelk wird hierbei die vor Ansetzen des Melkzeugs mit Hand ermolzene Milch bezeichnet. Da nicht sichergestellt werden kann, dass es sich ausschließlich um Zisternenmilch handelt wird die Probe als Anfangsgemelk und nicht als Vorgemelk bezeichnet. Als Gesamtgemelk wird die Milch bezeichnet, die mittels Melkmaschine nach Gewinnung des Anfangsgemelks von allen vier Vierteln ermolken wurde.

Es wurde während einer Melkzeit von verschiedenen Tieren je eine Probe vom Anfangsgemelk und vor dem Gesamtgemelk genommen. Das Gesamtgemelk wurde wie zuvor beschrieben mittels Tru-testern gewonnen. Das Anfangsgemelk wurde per Hand abgemolken. Da es sich bei dem Gesamtgemelk um Mischproben der vier Viertel handelt, wurde auch von dem Anfangsgemelk eine Mischprobe erstellt. Es wurden hierbei aus den Zitzen jeweils einige Milchstrahlen in das Probengefäß gemolken. Die weitere Probenbehandlung erfolgte für das Anfangs- und das Hauptgemelk in gleicher Weise.

Die gepaarten Proben (Anfangsgemelk und Hauptgemelk je Tier) wurden hinsichtlich SCC, Gesamtpartikelzahl und Partikelverteilung miteinander verglichen.

Um einschätzen zu können, inwieweit sich eine viertelindividuelle Probennahme auf das Ergebnis auswirken würde, wurde ein erkranktes Tier gesondert gemolken. Die drei gesunden Euterviertel wurden mittels Rohrmelkanlage in eine Kanne gemolken. Die Milch des erkrankten Viertels wurde per Hand abgemolken. Von beiden Milchproben wurde die Gesamtmenge bestimmt und jeweils eine Probe genommen. Im Labor wurde eine Mischprobe im Volumenverhältnis, wie es im Euter vorlag, aus der Milch der gesunden Viertel und der des kranken Viertels erstellt. Gemessen wurde die Milchproben des kranken Viertels, die der gesunden Viertel sowie die Mischprobe.

3.2.3.2 Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter

Die Partikelgrößenverteilung in der Milch von Tieren unterschiedlichen Gesundheitsstatus wurde betrachtet. Die Klassifikation des Gesundheitsstatus erfolgte anhand der organoleptischen Befunde sowie des mittels Fossomatic™ 5000 ermittelten SCC. Um deutliche Entwicklungen und Unterschiede zwischen dem Gesundheitsstatus und der Partikelgrößenverteilung zu sehen, wurden die Kurven der Milch unterschiedlicher Tiere zunächst deskriptiv verglichen. Relevant für die Krankheitserkennung sind nicht die Unterschiede zwischen den Tieren sondern die zwischen dem Gesundheitsstatus. Die jeweiligen Dateien, welche zur beispielhaften Darstellung ausgewählt wurden, wurden im Programm des Coulter Counters „Multisizer 3 Tm“ geöffnet. Zur besseren Übersichtlichkeit werden x- und y-Achse angepasst und die Graphen als Bild exportiert. Die unterschiedlichen Graphen wurden zur Ermittlung charakteristischer Bereiche, die sich mit dem Gesundheitsstatus möglicherweise verändern, betrachtet. Hierfür wurde mittels multiplen

paarweisen Vergleichen untersucht, ob die verschiedenen Gesundheitsstadien anhand von verschiedenen Partikelgrößenbereichen signifikant voneinander zu unterscheiden waren. Die Bereiche wurden dabei variiert, um die aussagekräftigsten Partikelgrößenbereiche zur Unterscheidung des Gesundheitsstatus zu finden.

Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse wurde anhand von 68 Doppelbestimmungen analysiert. Zwischen diesen wurde die Differenz aus den gepaarten Stichproben A und B ermittelt. Für den Datensatz wurden Minimum, Maximum, Median sowie das 25 % - und das 75 % - Quantil bestimmt.

3.2.3.3 Unterscheidung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren

Um mittels der Coulter Counter Messungen den Gesundheitsstatus der Tiere klassifizieren zu können, wurden Tiere mit bekanntem Gesundheitsstatus ausgewählt und deren Partikelgrößenverteilung analysiert. Als Status „gesund“ wurden Tiere ausgewählt, deren Milch organoleptisch unauffällig war und laut Messung mittels Fossomatic™ 5000 einen Zellgehalt von weniger als 100.000 Zellen/ml aufwies. Als „subklinisch erkrankt“ wurden Tiere eingeordnet, deren Milch organoleptisch unauffällig war, jedoch einen Zellgehalt von über 200.000 Zellen/ml hatte. Tiere mit einer Milch, welche organoleptisch verändert war, wurden als „krank“ definiert. Es wurden 126 Proben mit dem Status „gesund“, 70 mit dem Status „subklinisch erkrankt“ und 41 mit dem Status „krank“ als Trainingsdatensatz genutzt. Dieser diente zur Erstellung von Algorithmen zum Eutergesundheitsmonitoring.

Aus den Daten des Trainingsdatensatzes wurden aus den unter Kapitel 3.2.5 ermittelten kritischen Bereiche Quotienten mit der Gesamtpartikelzahl gebildet. Diese Quotienten waren:

QVG: Quotient zwischen den vorderen kritischen Bereich und der Gesamtpartikelzahl

QMG: Quotient zwischen den mittleren kritischen Bereich und der Gesamtpartikelzahl

Zur Klassifizierung der Daten war ein schrittweises analytisches Vorgehen notwendig. Im ersten Schritt wurden die Quotienten QMG und QVG gegeneinander aufgetragen. Hier wurde als erstes der Grenzwert zur Unterscheidung von kranken und nicht kranken Tieren ermittelt. Im zweiten Schritt wurde der Grenzwert zur Unterscheidung von subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren ermittelt. Die Auftrennung anhand dieser Parameter genügt in der

Ergebnisgüte nicht. Zur Optimierung wurde der QMG gegen den logarithmierten Wert der Gesamtpartikelzahl aufgetragen. Diese Auftragung soll die Möglichkeit testen, die subklinisch erkrankten Tiere von den gesunden und kranken zu trennen. Zur weiteren Auftrennung von Einzelproben wurde der QVG gegen den logarithmierten Wert der Gesamtpartikelzahl aufgetragen. Auch hier wurde die Trennung der Gesundheitsstadien anhand von zwei Funktionen durchgeführt.

Die Klassifizierung wird wie beschrieben durchgeführt und anhand des bekannten Gesundheitsstatus der Tiere auf ihre Genauigkeit überprüft.

Danach wurde zur Überprüfung der Güte der entwickelten Klassifikation ein Testdatensatz analysiert. Dieser enthielt insgesamt 84 Werte von 42 Tieren. Von diesen Tieren waren 30 als gesund, 10 als subklinisch erkrankt und 2 als akut krank klassifiziert.

Als Parameter zur Bewertung werden Sensitivität, Spezifität und Fehlerraten berechnet. Die Parameter werden ausgedrückt als:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Wahr Positive}}{\text{Wahr Positive} + \text{Falsch Negative}} \times 100$$

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{\text{Wahr Negative}}{\text{Wahr Negative} + \text{Falsch Positive}} \times 100$$

$$\text{Fehlerrate (\%)} = \frac{\text{Falsch Positive}}{\text{Falsch Positive} + \text{Wahr Positive}} \times 100$$

Hierbei sind „Wahr Positive“ und „Wahr Negative“ die Proben, welche den entsprechenden Status haben bzw. nicht haben und vom System auch diesem zugeordnet wurden, während „Falsch Positive“ vom System in den betreffenden Status eingeordnet wurden, diese jedoch real nicht zutrifft. Tabelle 9 verdeutlicht dies beispielhaft für den Status „gesund“.

Tabelle 9: Wahrheitsmatrix für den Status "gesund"

	Tier ist gesund	Tier ist nicht gesund
System ergibt „gesund“	Wahr Positiv	Falsch Positiv
System ergibt „nicht gesund“	Falsch Negativ	Wahr Negativ

Sensitivität, Spezifität und Fehlerrate werden jeweils für die gesunden Tiere, die subklinisch erkrankten Tiere und die kranken Tiere berechnet.

3.2.3.4 Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Mastitis

Um die Entwicklung der Partikelgrößenverteilung im Krankheitsverlauf zu betrachten, wurden verschiedene erkrankte Tiere bis zur Ausheilung der Mastitis beobachtet. Hierfür wurde der Betrieb gebeten, erkrankte Tiere zu melden und von jeder Melkung eine Gesamtgemelksprobe zu nehmen. Die Probennahme erfolgte bis zum Zeitpunkt, zu dem die Milch wieder bei der Molkerei ablieferbar war. Um die Tiere untereinander zu vergleichen, wurden die Melkungen im zeitlichen Abstand zum Krankheitsausbruch nummeriert. Nummer eins war hierbei der Zeitpunkt/die Melkung, zu der das Tier als krank auffällig wurde. Die Melkungen wurden fortlaufend nummeriert. Dabei war nicht die Nummer der Probe ausschlaggebend, sondern die Melkung nach der Diagnose. Aus diesem Grunde fehlen für einige Verläufe einzelnen Nummern, da hier keine Milchproben vorlagen, die Kuh aber dennoch gemolken wurde. Insgesamt wurden die Krankheitsverläufe von 15 Tieren über einen Zeitraum von bis zu 44 Melkungen betrachtet.

Bei drei der Tiere, deren Partikelgrößenverteilung in der Milch über den Verlauf der Mastitis untersucht wurde, kam es im Heilungsverlauf zu einem erneuten Krankheitsausbruch. Für diese Tiere wurden jeweils die zwei Melkungen vor dem erneuten starken Anstieg der Zellzahl mittels der Kennzahlen für die Partikelgrößenverteilung analysiert. Für jedes Tier wurden der mittels Fossomatic™ 5000 ermittelte SCC, die mittels Coulter Counter ermittelte Partikelzahl im vorderen und mittleren kritischen Bereich, QVG und QMG und des ermittelten Status dargestellt.

Hierdurch soll festgestellt werden, ob die entwickelten Algorithmen zur Identifikation des Gesundheitsstatus anhand der Zellgrößenverteilung geeignet sind, um eine Krankheit frühzeitig, möglicherweise bereits vor dem ersten starken Anstieg des SCC, zu erkennen.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

Das zentrale Ziel der Probenaufbereitung war eine vollständige Abtrennung des MilCHFettes, bei einem gleichzeitig erwünschten maximalen Gehalt an somatischen Zellen in der fettfreien Probe. Dies ist die Voraussetzung, um den Coulter Counter zur Messung der somatischen Zellen und zur Bestimmung der Zellgrößenverteilung in der Milch nutzen zu können. Bereits bei der Trennung der Fraktionen zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten. So ließ sich die Fettschicht bei höheren Geschwindigkeiten deutlich besser von den übrigen Fraktionen trennen als bei $400 \times g$. Tabelle 10 zeigt den Zellgehalt in den verschiedenen Fraktionen bei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten.

Tabelle 10: Least squares means (LSM) mit den jeweiligen 95% Konfidenzintervallen (KI) des SCC für die verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Fraktionen

			Fraktion			
			F	Ü	ÜP	P
Zentrifugationsgeschwindigkeit in g	400	unteres 95% KI	54.335	45.931	70.080	26.107
		LSM	61.750 DE	52.750 EFG	78.500 CD	31.250 H
		oberes 95% KI	70.178	60.581	87.932	37.407
	800	unteres 95% KI	31.593	32.512	104.950	48.727
		LSM	37.250 GH	38.250 GH	115.250 AB	55.750 EF
		Oberes 95% KI	43.920	45.001	126.560	63.785
	1600	unters 95% KI	13.982	31.134	105.900	88.299
		LSM	17.750 I	36.750 GH	116.250 AB	97.750 BC
		oberes 95% KI	22.534	43.379	127.610	108.210
	3200	unters 95% KI	13.542	32.971	119.980	59.491
		LSM	17.250 I	38.750 FGH	131.000 A	67.250 DE
		oberes 95% KI	21.974	45.542	143.030	76.021

LSM mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (multipler paarweiser T-Test mit simulierter Anpassung, $\alpha=0.05$).

P: Pellet, Ü: Überstand, ÜP: Überstand +Pellet, F: Fett

Um das zuvor genannte Ziel der Probenaufbereitung zu erreichen, sollte sich in der Fraktion „Fett“ ein möglichst geringer Gehalt an Zellen finden, da diese Fraktion verworfen werden muss. Am geeignetsten ist die Fraktion, die einen möglichst hohen SCC aufweist, sofern der Fettgehalt dieser Fraktion gering ist. In Tabelle 10 ist zu sehen, dass der Zellgehalt in der Fettfraktion bei $1.600 \times g$ als auch bei $3.200 \times g$ am geringsten ist. Die Unterschiede zu den niedrigeren Geschwindigkeiten sind dabei signifikant. Aufgrund des hohen Gehalts an somatischen Zellen in der Fettfraktion erfüllen Geschwindigkeiten von $400 \times g$ und $800 \times g$ nicht die Zielvorgabe einer geeigneten Probenaufbereitung. Des Weiteren ergibt die Auswertung, dass sich der Gehalt an Zellen in den übrigen Fraktionen bei $1.600 \times g$ und $3.200 \times g$ untereinander signifikant unterscheidet. So enthält das Zellpellet, welches von vielen Autoren zur Analyse der somatischen Zellen genutzt wird, weniger Zellen als das Gemisch des Pellets im Überstand, wie die Versuchsergebnisse in Tabelle 10 deutlich zeigen. Der Unterschied zwischen dem Gemisch zwischen $1.600 \times g$ und $3.200 \times g$ ist dabei nicht signifikant. Folglich würde die Nutzung des Fraktionsgemisches aus Zellpellet und dem Überstand nach einer Zentrifugation mit mindestens $1.600 \times g$ den geringsten Zellverlust für die Analyse mit dem Coulter Counter bedeuten.

Tabelle 11 zeigt den Fettgehalt in den verschiedenen Fraktionen nach der Zentrifugation mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. In der zu messenden Probe soll der Fettgehalt nahezu bei null liegen.

Tabelle 11: Least squares means (LMS) des Fettgehaltes in % abhängig von Zentrifugationsgeschwindigkeit und Milchfraktion
(Standardabweichung: +/- 0,04736)

Fraktion		F		Ü		ÜP		P	
Zentrifugations- geschwindigkeit	$400 \times g$	1.5400	D	2.2000	B	2.1025	C	0.0300	G
	$800 \times g$	2.1450	C	1.5425	D	1.5825	D	0.0350	G
	$1600 \times g$	2.8250	B	0.8650	E	0.6100	F	0.0550	G
	$3200 \times g$	3.4550	A	0.1575	G	0.1200	G	0.0325	G

LSM mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (multipler paarweiser T-Test mit simulierter Anpassung, $\alpha=0.05$).

P: Pellet, Ü: Überstand, ÜP: Überstand +Pellet, F: Fett

Die Fettentfernung gelingt am besten, wenn lediglich das Zellpellet genutzt wird. Dabei ist der Fettgehalt im Pellet unabhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Die Analyse des Zellgehaltes in den verschiedenen Fraktionen hat jedoch gezeigt, dass bei der ausschließlichen Nutzung des Zellpellets ein großer Anteil der somatischen Zellen in den verworfenen Fraktionen zurück bleibt und somit nicht analysiert werden kann. Der Gehalt an Fett in den Fraktionen, die den Überstand enthalten, ist generell höher als der der Zellpellets, auch wenn der Unterschied bei einer Geschwindigkeit von $3.200 \times g$ nicht signifikant ist. Je geringer die Zentrifugationsgeschwindigkeit ist, desto mehr Fett verbleibt in der Probe zurück.

Insgesamt lieferte eine Zentrifugation bei $1600 \times g$ bei 4°C für 15 Minuten das optimale Ergebnis der Abtrennung von zellhaltiger Fraktion und Fett bei gleichzeitig möglichst geringer Belastung für die somatischen Zellen. Es zeigte sich jedoch, dass in Bereichen von Fettgehalten, die durch den MilkoScanTM FT kaum noch messbar sind, dennoch Reste von Fett in der Probe vorhanden sind. Diese Reste überlagern den Bereich der Zellen und verfälschen damit die Messung. Abbildung 3 zeigt die Partikelverteilung einer Milchprobe ohne Fettabtrennung.

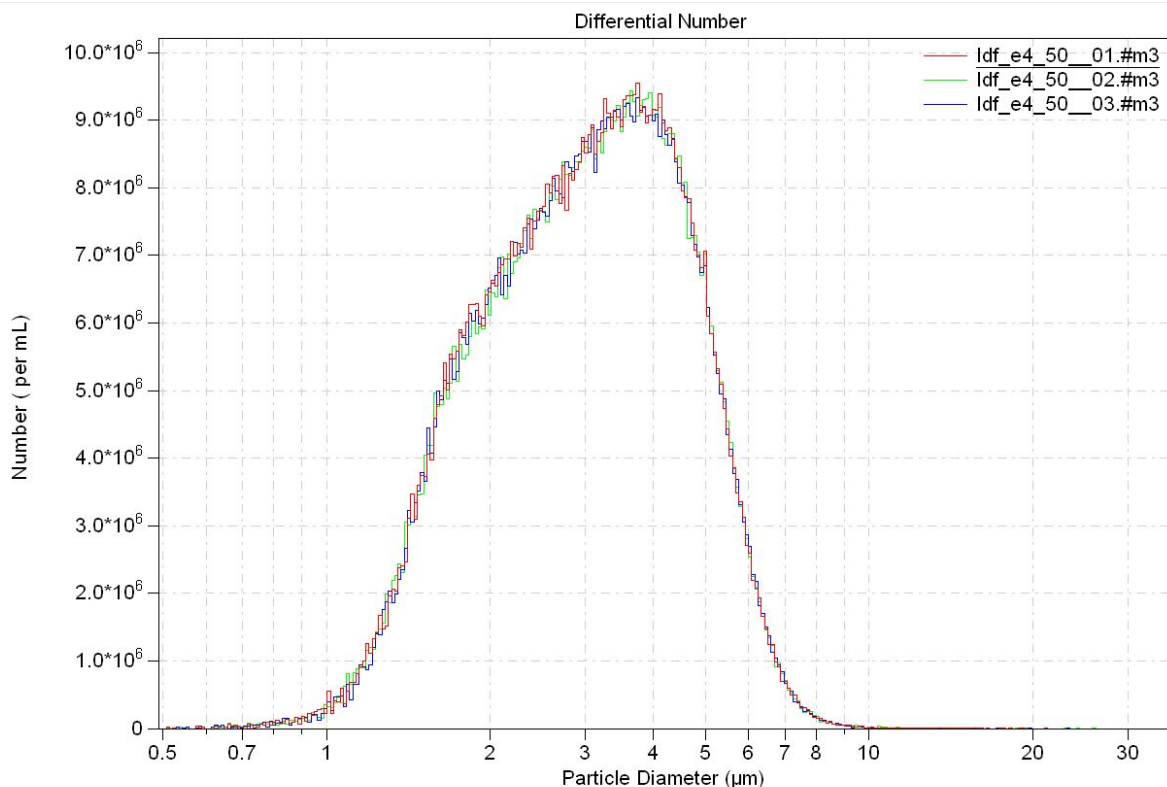


Abbildung 3: Milchprobe mit Fett im Coulter Counter gemessen

Bei der üblichen Zentrifugation, mit ebenfalls $1600 \times g$ bei 4°C für 15 min, musste das Fett abgespätelt werden. Durch diesen mechanischen Eingriff wurden kleine Mengen von Fett aufgewirbelt und dadurch wieder in den Überstand eingetragen. Dies zeigte sich an Partikelgrößenverteilungen, die erst in höheren Bereichen deutlich abflachen (Abbildung 4).

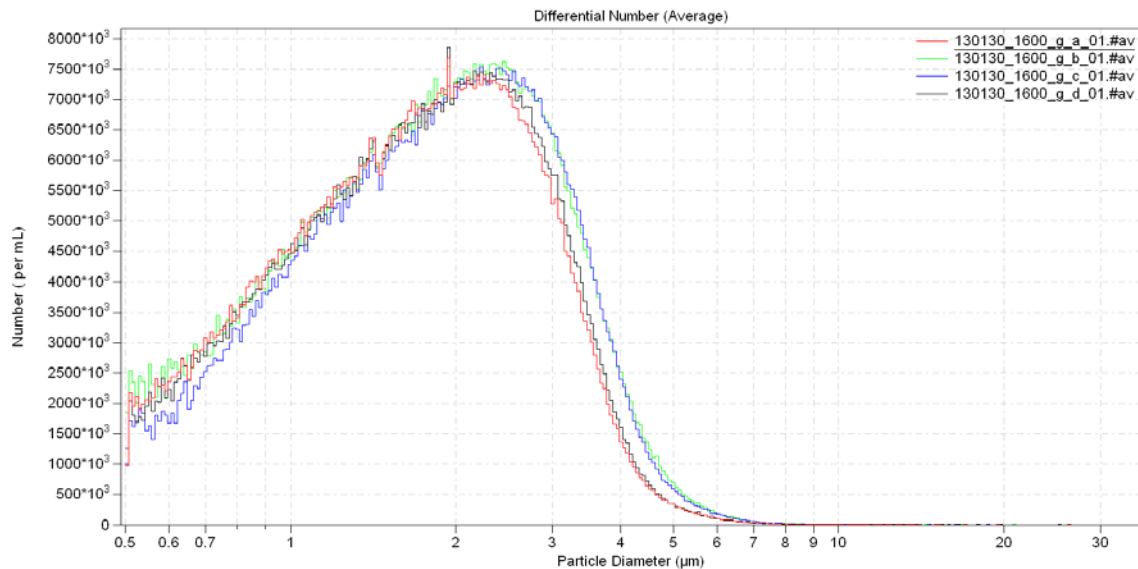


Abbildung 4: Partikelgrößenverteilung bei unvollständiger Fettabtrennung

Abbildung 5 zeigt die Partikelgrößenverteilung nach vollständiger Fettabtrennung mittels Überkopfzentrifugation ($1600 \times g$, 4°C , 15 min). Die Kurven sind bereits bei einer Partikelgröße von $3 \mu\text{m}$ nahezu vollständig abgeflacht. Kein Fett überlagert den Bereich der somatischen Zellen.

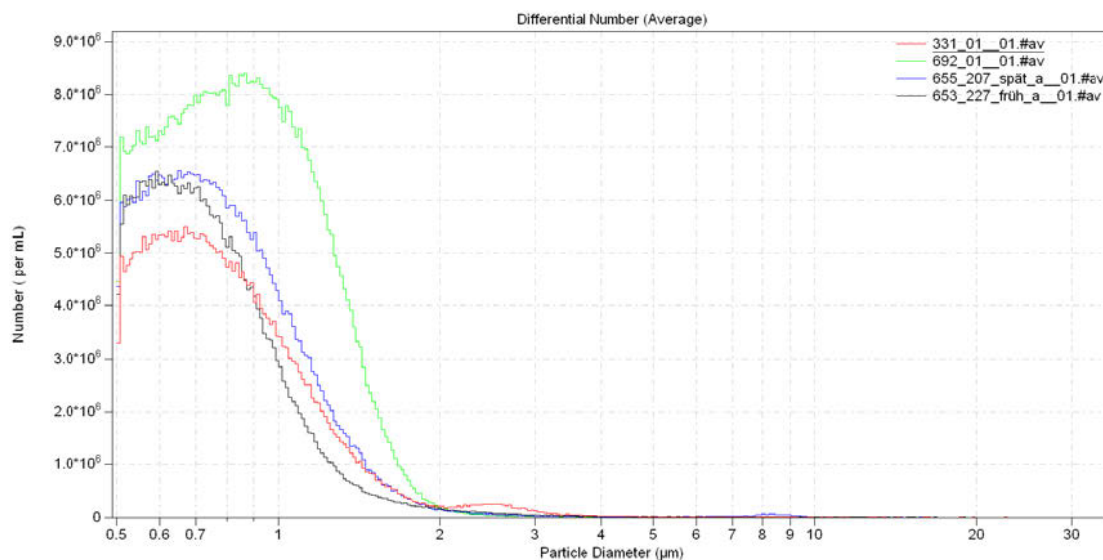


Abbildung 5: Partikelverteilung nach vollständiger Fettabtrennung

Insgesamt erfüllt die Überkopfzentrifugation bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von $1600 \times g$ für 15 Minuten die Bedingungen an die Probenaufbereitung für den Coulter Counter. Es ist somit möglich, den größtmöglichen Anteil Zellen der Milch mittels eines schnellen Aufbereitungsprotokolls ohne Zusatzsubstanzen im Coulter Counter messbar zu machen.

4.2 Messmethode zur Bestimmung des SCC im Coulter Counter

4.2.1 Bestimmung des Messbereichs zur Zellzahlbestimmung im Coulter Counter

Um den geeigneten Messbereich zur Ermittlung der Zellzahl im Coulter Counter zu bestimmen, wurden Milchproben unterschiedlichen Zellgehaltes analysiert. Der SCC der untersuchten Proben deckte einen Bereich zwischen $30 \cdot 10^3$ Zellen/ml und $3.000 \cdot 10^3$ Zellen/ml ab. Der Fettgehalt der Proben variierte zwischen 1,86 und 8,76 %. Die statistische Analyse ergab lediglich für den unteren Grenzwert von 5,5 μm keinen signifikanten Unterschied zu den SCC Werten, welche mittels Fossomatic™ 5000 ermittelt wurden. In sehr hohen Zellzahlbereichen wurde der SCC mit dem Coulter Counter unterschätzt. Abbildung 6 zeigt die mittels Fossomatic™ 5000 und Coulter Counter ermittelten SCC im Vergleich. Zur Orientierung ist die Winkelhalbierende in der Grafik aufgetragen. Abbildung 7 ist ein Ausschnitt von Abbildung 6, um die Lage der Messwerte in den unteren Zellzahlbereichen deutlicher darzustellen.

Es ist eine Streuung der Werte zu erkennen. Bei den höheren Zellzahlen über 1.000.000 Zellen/ml (mit Fossomatic™ 5000 ermittelt) werden die Werte mit dem Coulter Counter unterschätzt. Allerdings liegen die Werte trotz deutlicher Unterschätzung ausnahmslos über einem Bereich von 200.000 Zellen/ml und würden so trotz Unterschätzung als krank identifiziert werden können.

Ein Messbereich von 5,5 μm bis 30 μm ermöglicht die Bestimmung des SCC durch den Coulter Counter. Die Ergebnisse unterliegen größeren Schwankungen als bei der Bestimmung mittels Fossomatic™ 5000 und werden in sehr großen Zellzahlbereichen unterschätzt.

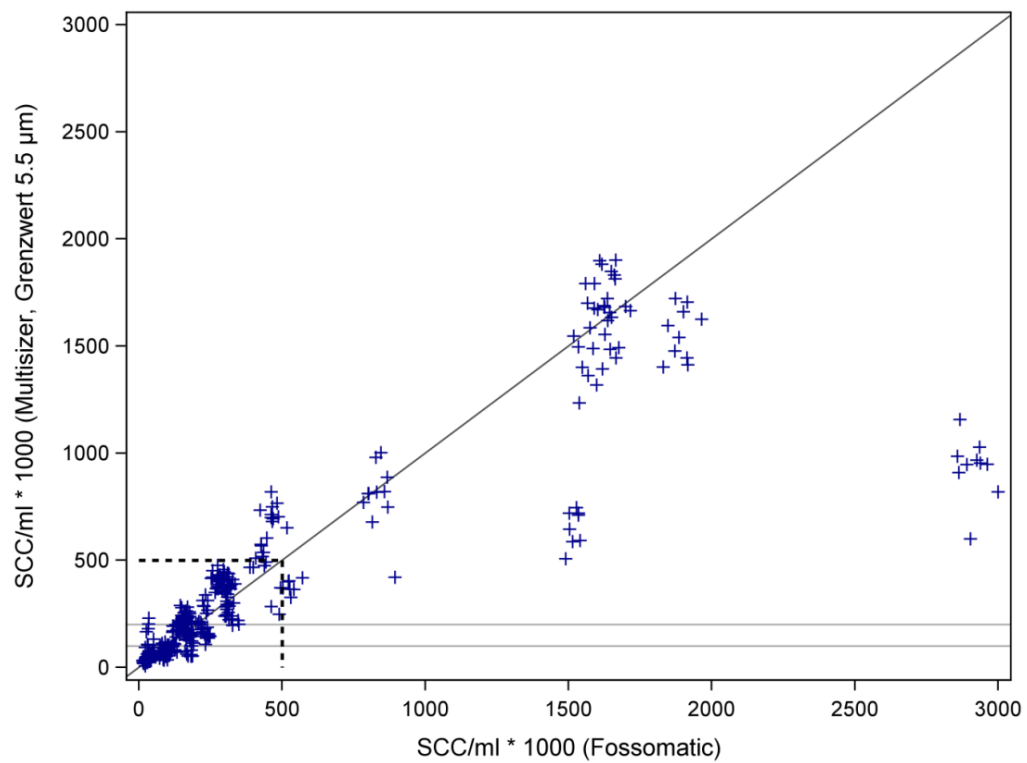


Abbildung 6: Vergleich des SCC ermittelt mittels Fossomatic™ 5000 und Coulter Counter (für die Partikelgrößen von 5,5 µm bis 30 µm)

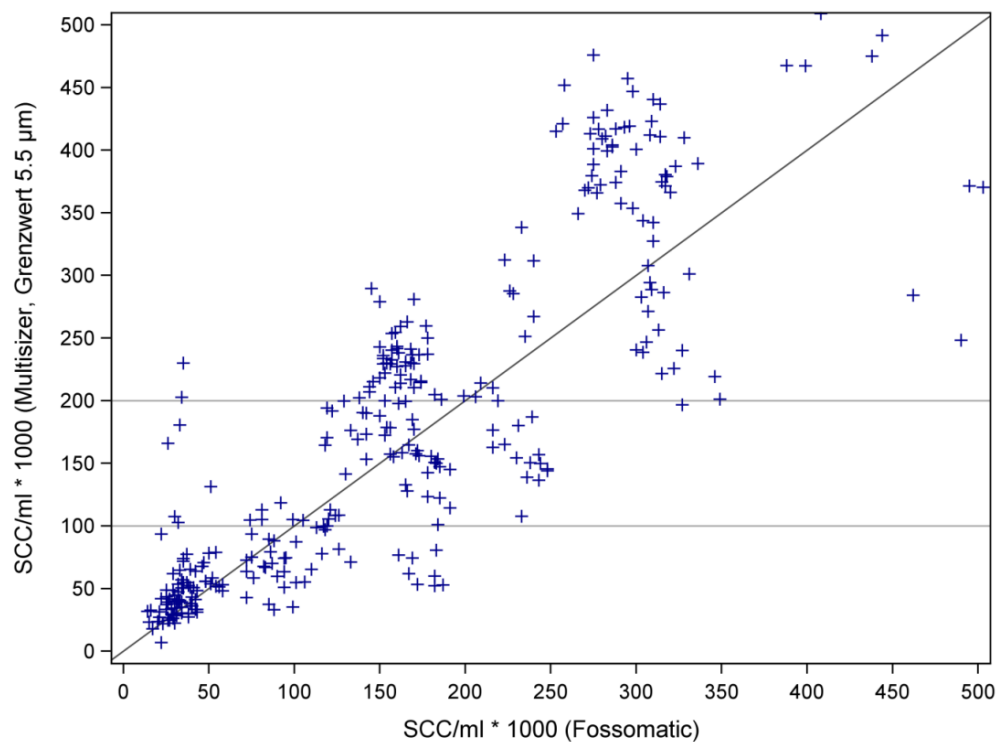


Abbildung 7: Vergleich des SCC ermittelt mittels Fossomatic™ 5000 Fossomatic und Coulter Counter (für die Partikelgrößen von 5,5 µm bis 30 µm) (Detailausschnitt von Abbildung 6)

4.2.2 Vergleich der entwickelten Aufbereitungsmethode mit der Methode nach IDF-Standard

Von jeder der 73 Gesamtgemelksproben wurde mit jeder Methode ein Aliquot untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass zwischen allen drei Methoden Unterschiede zu finden sind. Abbildung 8 zeigt die Proben, die nach der entwickelten Zentrifugationsmethode für die Messung im Coulter Counter vorbereitet wurden, im Vergleich zu denen, welche mittels der im IDF-Standard (IDF, 1991) beschriebenen Methode vorbereitet wurden. Der Messbereich für beide Methoden wurde von 5,5 μm bis 30 μm gewählt. Abbildung 16 zeigt den Vergleich des SCC gemessen mit dem Coulter Counter nach der Aufbereitung mittels IDF- bzw. Zentrifugationsmethode. Zur Verdeutlichung ist die Winkelhalbierende aufgetragen. Es ist klar zu erkennen, dass beide Methoden unterschiedliche Messwerte liefern. Die Verteilung der Messwerte zeigt jedoch ebenfalls, dass keine Methode generell höhere oder niedrigere Werte als die andere liefert.

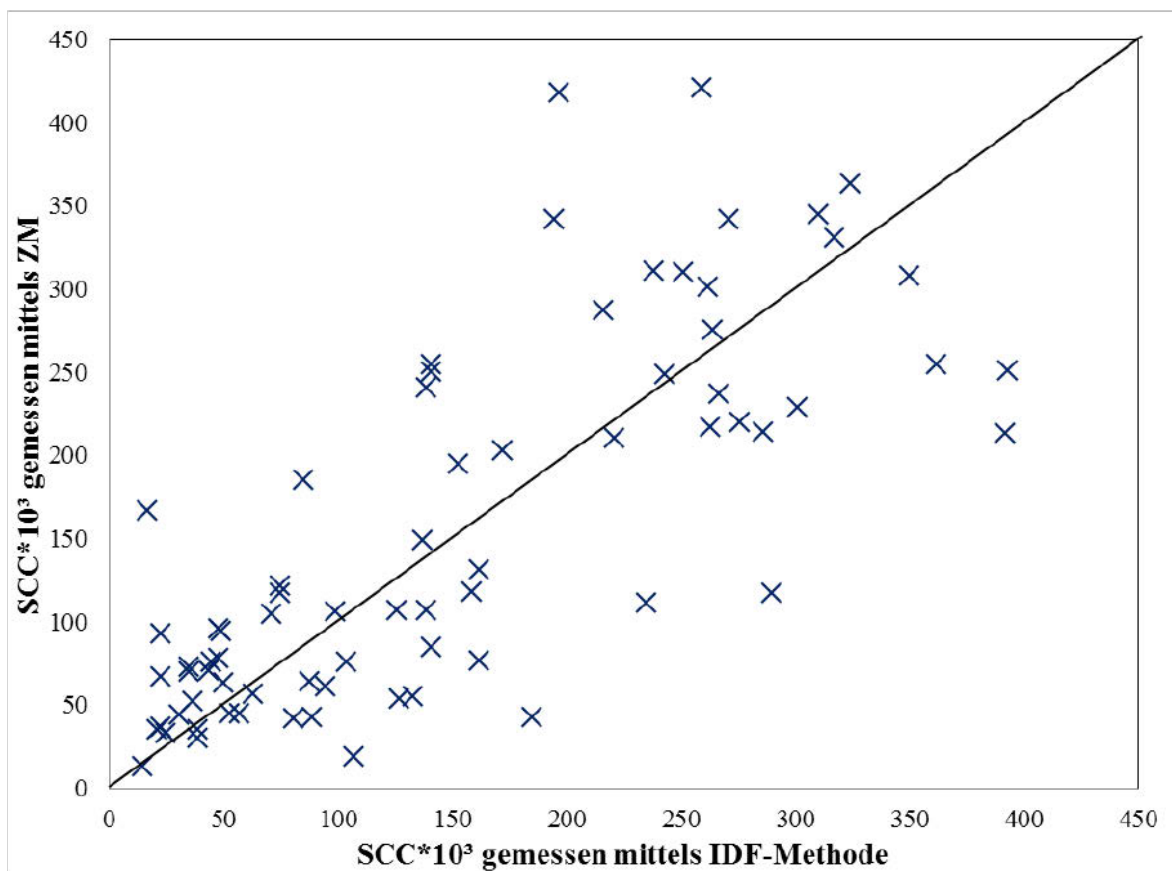


Abbildung 8: Vergleich des SCC nach der Aufbereitung nach IDF bzw. nach Zentrifugation (ZM)

In Abbildung 9 ist die Differenz aus dem dekadischen Logarithmus des SCC je einer Methode und dem des Referenzwertes (SCC mittels Fossomatic bestimmt) über dem logarithmierten Mittelwert dieser aufgetragen. Zu sehen ist dabei die Streuung um den Referenzwert sowie der Trend über die mittlere Zellzahl. Abbildung 10 zeigt dies für einen SCC bis zu 300.000 Zellen/ml. Die Abbildungen zeigen, dass zwischen den beiden Aufbereitungsmethoden kein Unterschied in der Spannweite der Abweichungen zum Referenzwert vorliegt. Für Zellzahlen bis 300.000 Zellen/ml liefert die Aufbereitung mittels Zentrifugation im Vergleich zum Referenzwert etwas bessere Ergebnisse, als die Aufbereitung nach IDF-Standard. Dies zeigt sich in der annähernden Übereinstimmung der Mittelwerte im Vergleich zum Referenzwert.

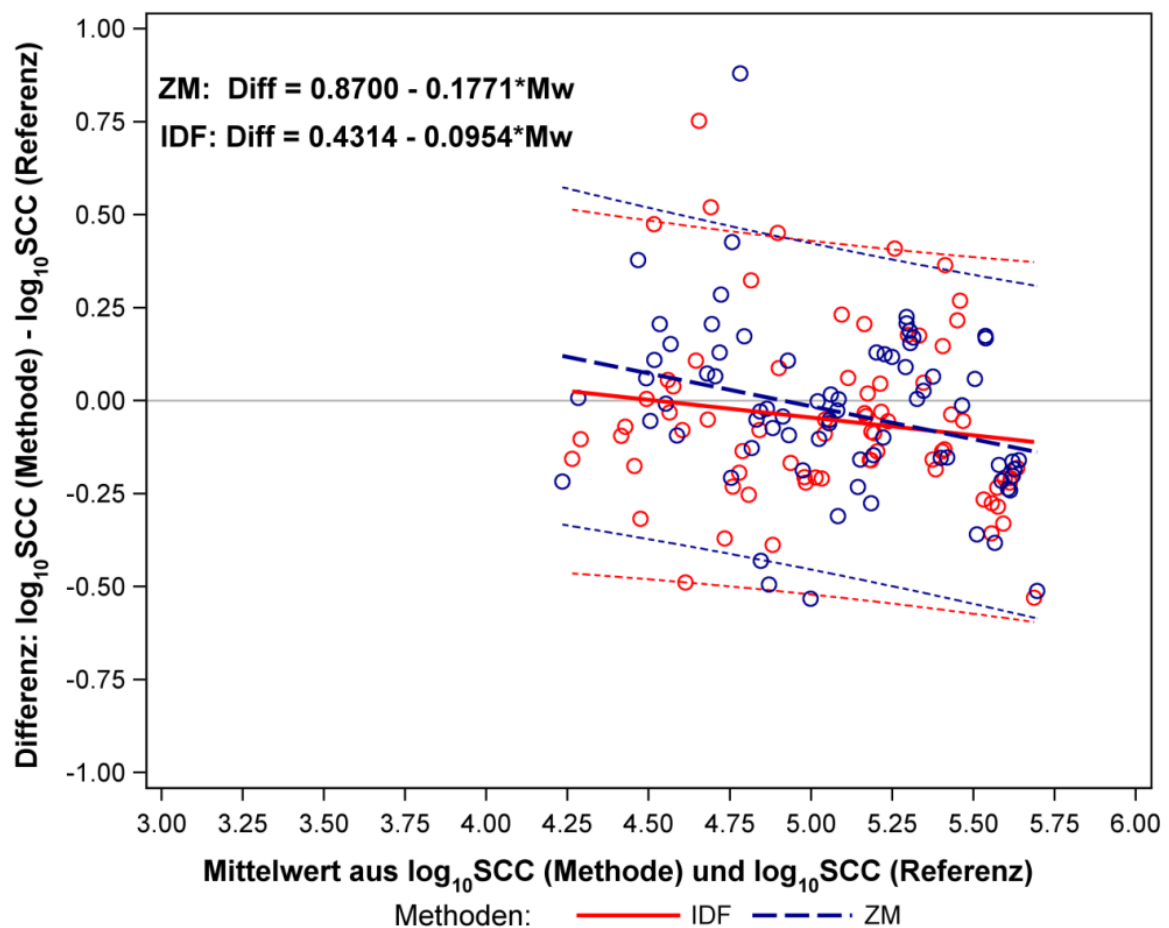


Abbildung 9: Differenz der logarithmierten SCC Werte der beiden Coulter Counter Methoden zur Referenzmethode aufgetragen gegen die logarithmierten Mittelwerte der Methoden

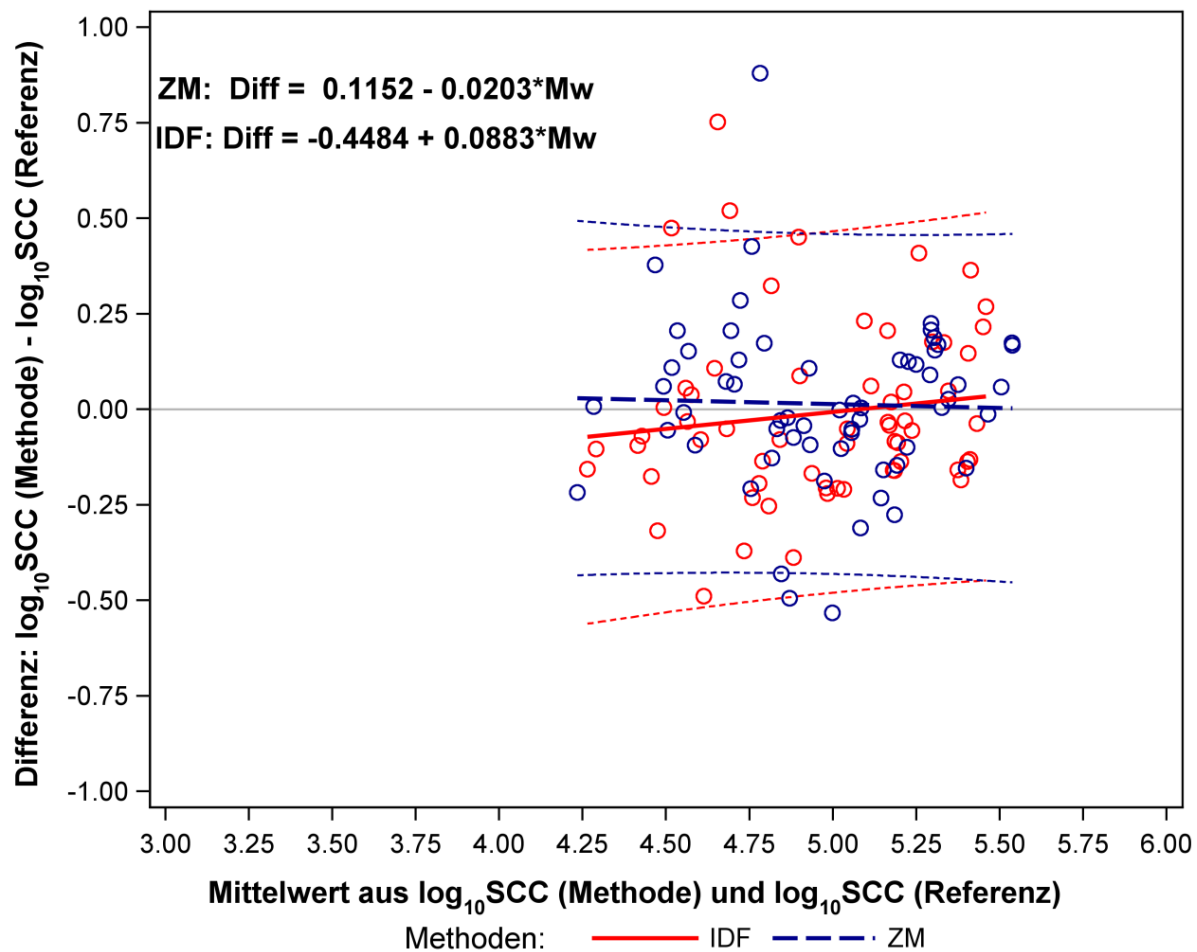


Abbildung 10: Differenz der logarithmierten SCC Werte der beiden Coulter Counter Methoden zur Referenzmethode aufgetragen gegen die logarithmierten Mittelwerte der Methoden, für Zellgehalte bis 300.000 Zellen/ml

In der Genauigkeit ist die in dieser Arbeit entwickelte Aufbereitungsmethode mit der Methode nach dem früheren IDF-Standard vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen demnach in der Güte keinen Nachteil im Vergleich zu dem genannten Standard.

4.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung

4.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen

Die Zellzahlen in Anfangs- und Gesamtmelk sind nicht vergleichbar. Abbildung 11 zeigt die mit der Referenzmethode ermittelten Zellzahlen für das Anfangs- und das Gesamtmelk verschiedener Tiere.

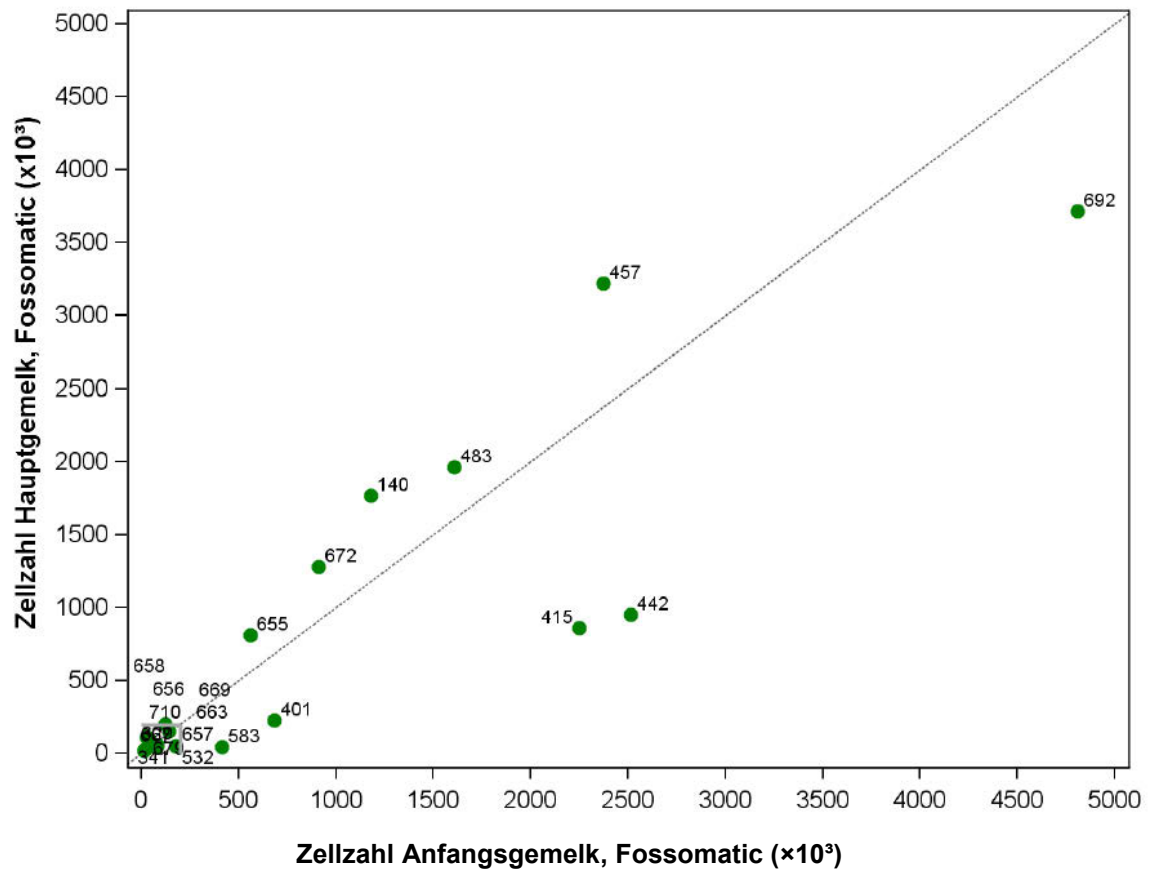


Abbildung 11: Vergleich der Zellzahlen von Anfangsgemelk (x-Achse) und Gesamtgemelk ermittelt mittels Fossomatic™ 5000

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Partikelgrößenverteilungen beispielhaft für jeweils Anfangs- und Gesamtgemelk zweier gesunder Tiere. Bei den gesunden Tieren mit den generell sehr geringen Zellgehalten sind keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Milchproben vorhanden..

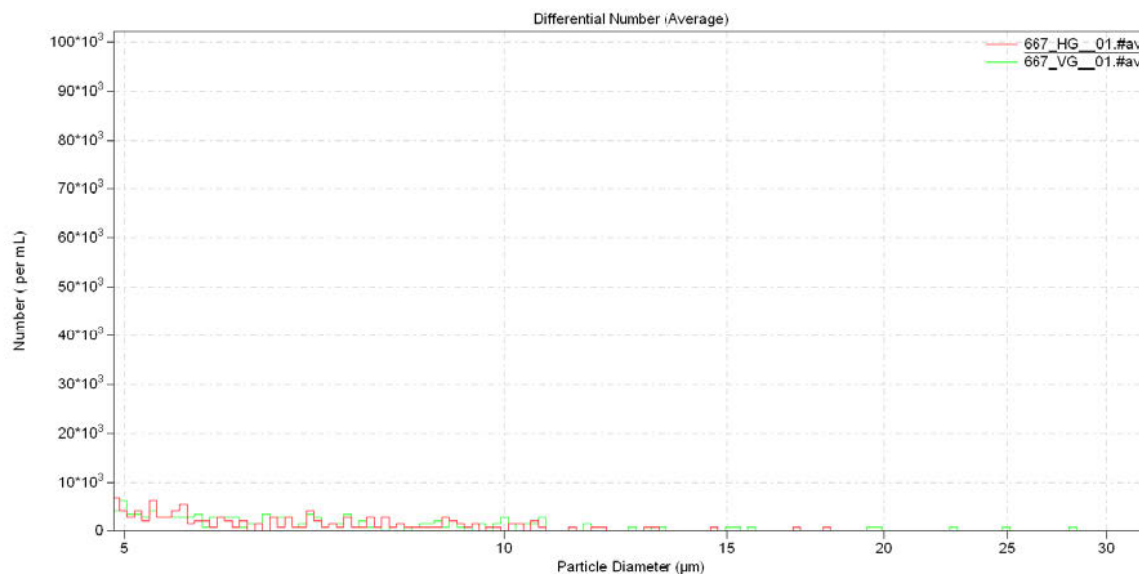


Abbildung 12: Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 667 (gesund)
Grün: Anfangsgemelk, rot: Gesamtgemelk

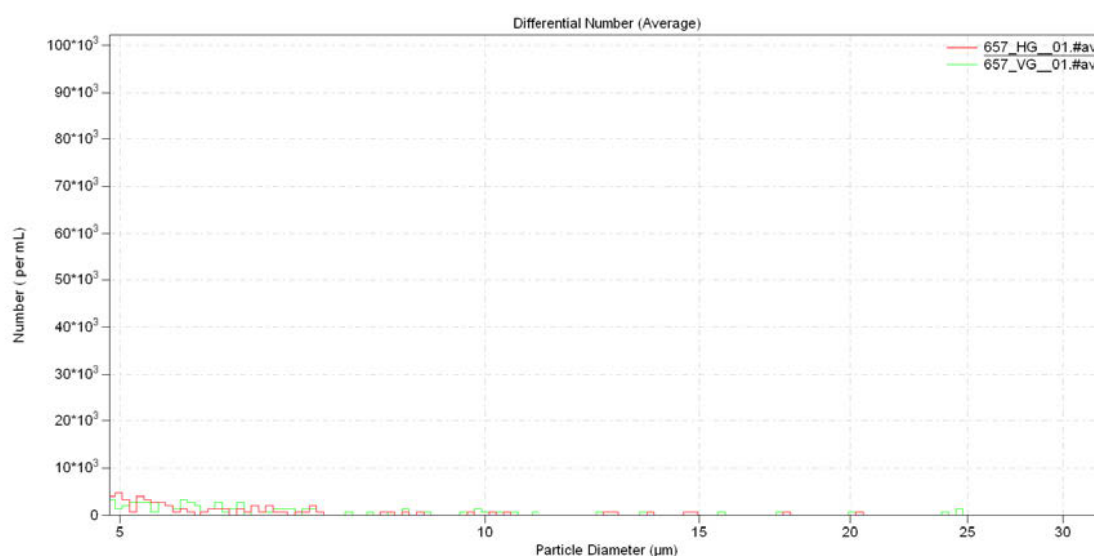


Abbildung 13: Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 657 (gesund)
Grün: Anfangsgemelk, rot: Gesamtgemelk

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Partikelgrößenverteilungen von zwei subklinisch erkrankten Kühen im Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk. Hier sind deutliche Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung zu sehen. Während bei Tier 415 der Peak des Anfangsgemelks höher ausfällt und im Vergleich zu der Kurve des Gesamtgemelks leicht nach vorne verschoben ist, ist der Unterschied bei Tier 692 deutlich stärker ausgeprägt. Hier ist im Anfangsgemelk lediglich ein Peak mit einem Maximum bei etwa 8 µm zu sehen. Die

Kurve des Gesamtgemelks hingegen zeigt einen Doppelpeak mit den Maxima bei 7 μm und 10 μm .

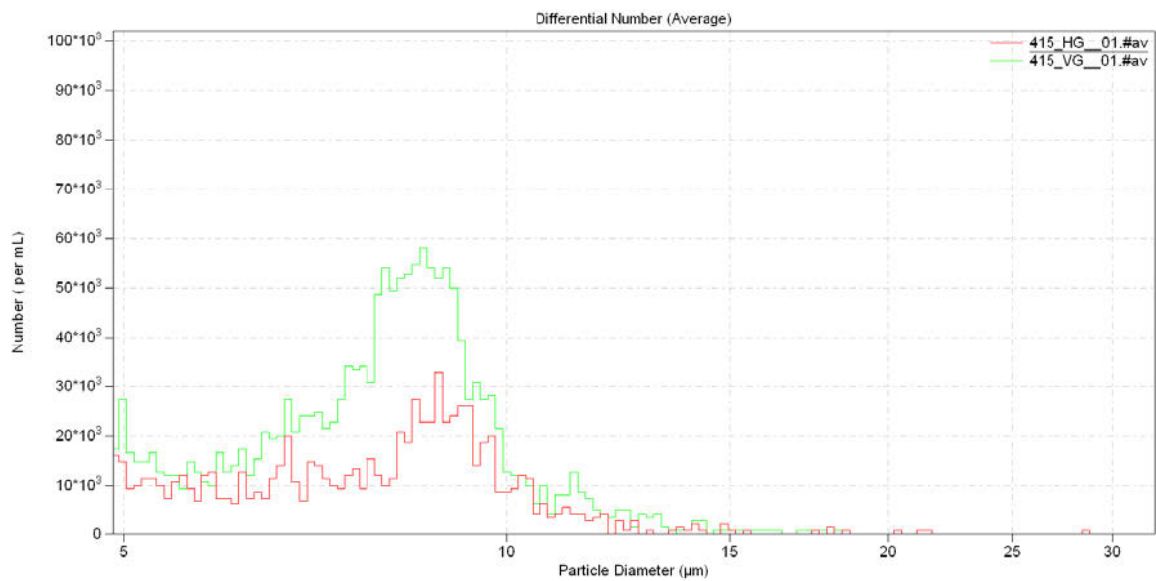


Abbildung 14: Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 415 (subklinisch erkrankt)
grün: Anfangsgemelk, rot: Gesamtgemelk

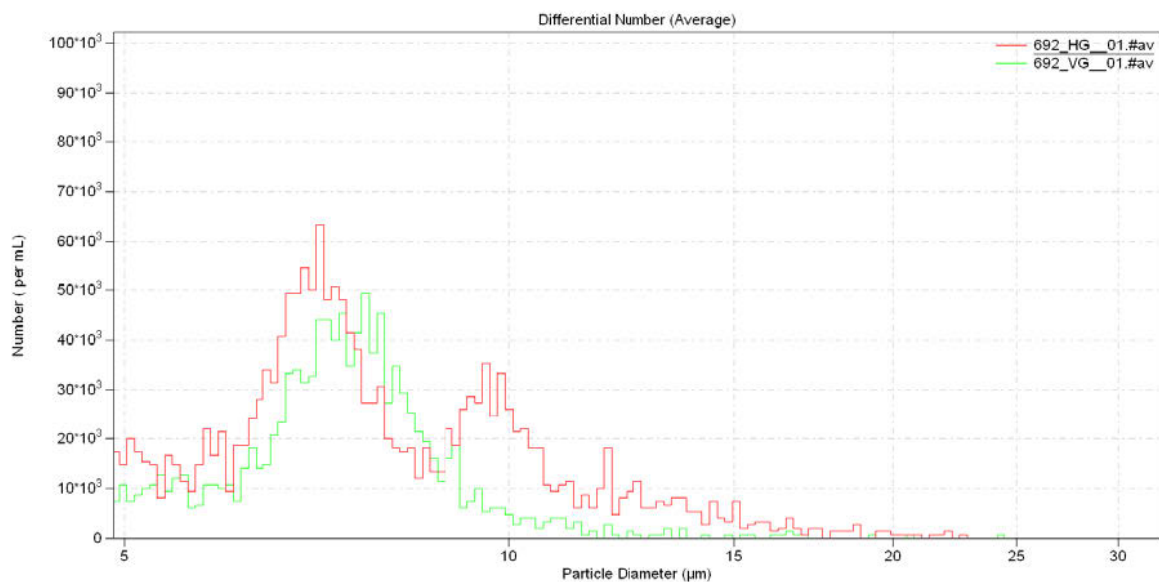


Abbildung 15: Vergleich von Anfangs- und Gesamtgemelk der Kuh 692 (subklinisch erkrankt)
Grün: Anfangsgemelk, rot: Gesamtgemelk

Der Vergleich der Partikelgrößenverteilung von Anfangs- und Hauptgemelk zeigt, dass nicht nur Unterschiede in der Gesamtpartikelzahl vorliegen. Gerade im Falle nicht gesunder Tiere verändert sich die Partikelgrößenverteilung mitunter gravierend. Demnach ist es nicht möglich, ein Gesundheitsmonitoring, welches auf das Hauptgemelk validiert ist, ohne Anpassung auf andere Milchfraktionen zu übertragen.

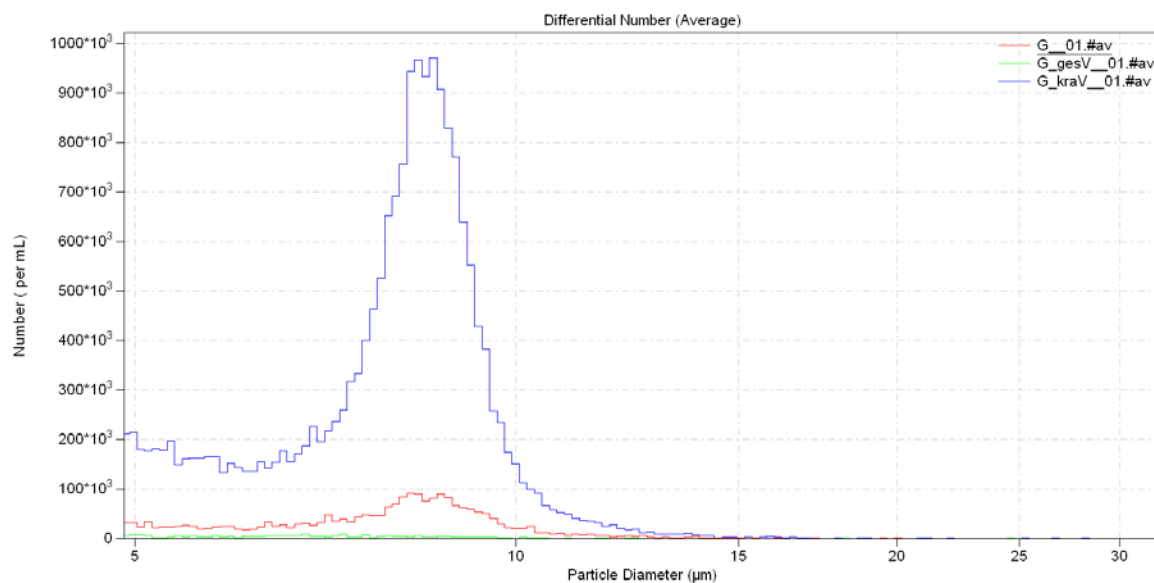


Abbildung 16: Milch einer an Mastitis erkrankten Kuh, Gemelk des kranken Euterviertels (blau), Gemelk der drei gesunden Viertel (grün), Gesamtgemelk (rot)

Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen der Partikelgrößenverteilung des Gesamtgemelks aller Euterviertel eines Tieres, dem Gemelk der gesunden Viertel sowie dem Gemelk des kranken Viertels. Es zeigt sich, dass der Peak im Gesamtgemelk durch die Verdünnung deutlich abgeschwächt wird. Dennoch ist der Verlauf der Kurve an sich identisch. Lediglich der Ausschlag ist bei einer viertelindividuellen Betrachtung der Erkrankung deutlich höher. Der Einfluss der Milch des erkrankten Viertels auf die Partikelgrößenverteilung im Gesamtgemelk ist trotz des geringen Volumens im Vergleich zur Milch aus den gesunden Vierteln deutlich sichtbar.

4.3.2 Partikelgrößenverteilung gemessen im Coulter Counter

Die genutzte 50 µm Kapillare kann einen Partikelgrößenbereich von 0,5 µm bis 30 µm messen (Abbildung 17). Im Bereich zwischen 0,5 µm und 2 µm ist bei allen Proben ein

deutlicher Peak zu sehen. Dieser ist für die Erkennung und Zählung der somatischen Zellen jedoch nicht relevant, da diese in einem anderen Größenbereich liegen. Um den relevanten Bereich, der die Größenbereiche aller somatischer Zellen abdeckt, besser beurteilen zu können, werden die Achsen angepasst. Die Anpassung erfolgt in der x-Achse analog zu dem ermittelten Bereich für die Zellzählung, in der y-Achse entsprechend der Partikelzahl (Abbildung 18).

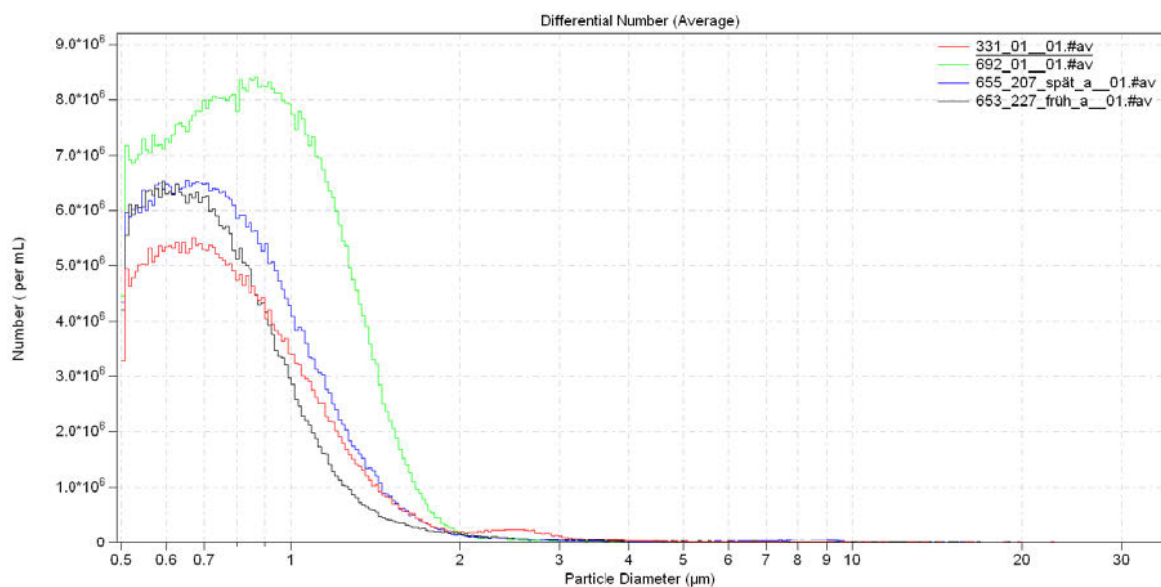


Abbildung 17: Graphen der Partikelgrößenverteilung verschiedener Milchproben aus dem Coulter Counter Programm ohne Anpassung der Achsen

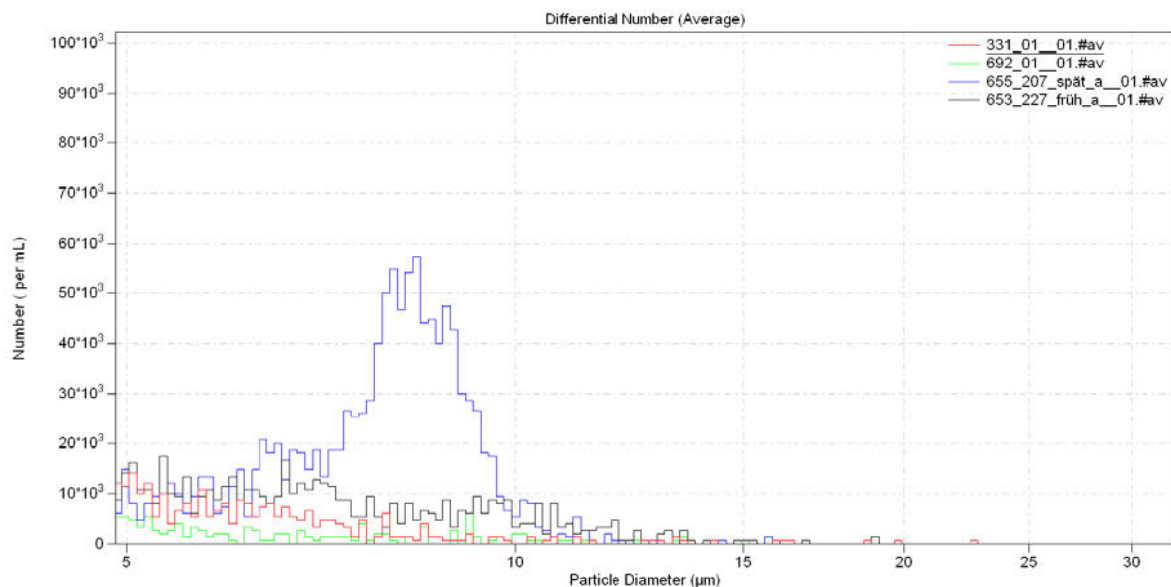


Abbildung 18: Graphen der Partikelgrößenverteilung verschiedener aus dem Coulter Counter nach Anpassung der Achsen
(gesund: rot und grün; krank: blau und schwarz)

Es ist zu erkennen, dass sich die Partikelgrößenverteilung in der Milch erkrankter Tiere (blaue und schwarze Kurve) deutlich von der gesunder Tiere (rote und grüne Kurve) unterscheidet. Es ist kein gleichmäßiger Anstieg der Kurve, bedingt durch die erhöhte Zellzahl, zu sehen, vielmehr bilden sich im Falle einer Mastitis deutliche Peaks aus. Abbildung 19 zeigt beispielhaft die Partikelverteilung je einer gesunden, einer subklinisch und einer klinisch erkrankten Kuh im Vergleich. Besonders auffällig ist der Bereich etwa zwischen 5 μm und 12 μm .

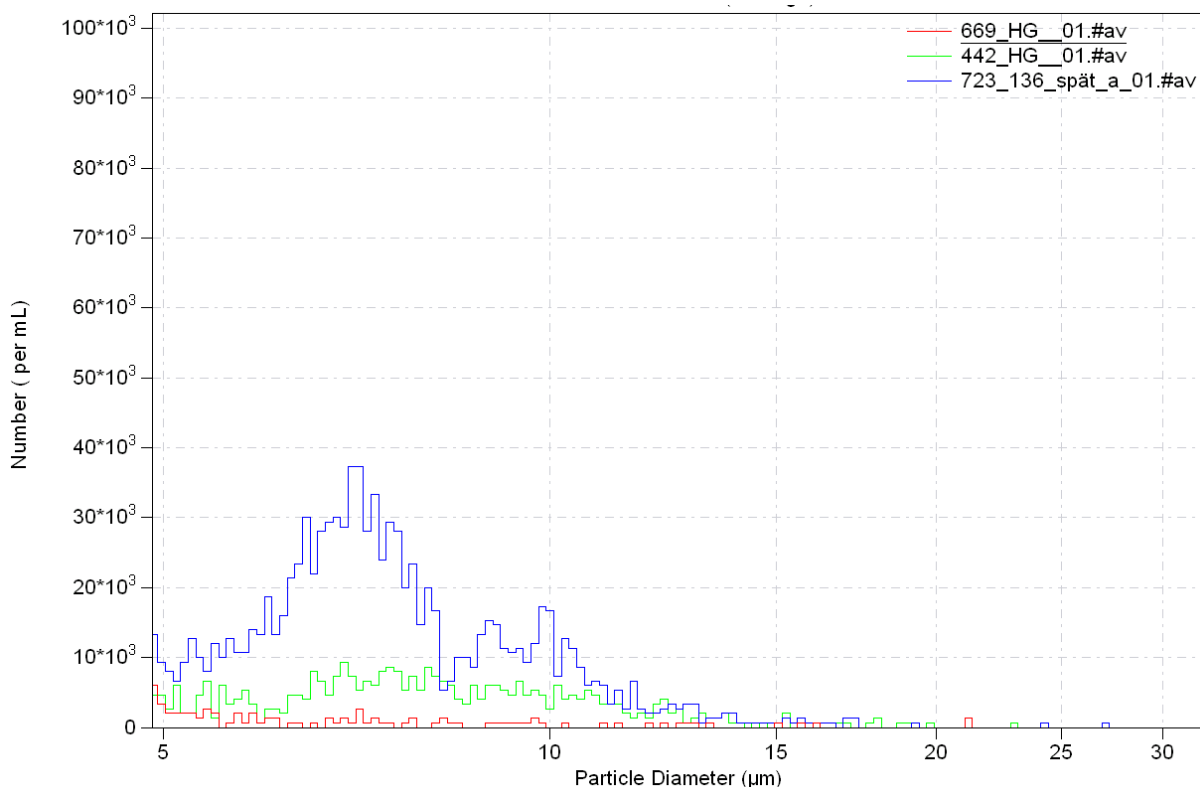


Abbildung 19: Partikelgrößenverteilung drei verschiedener Milchproben
(gesund: rot, subklinisch erkrankt: grün, klinisch erkrankt: blau)

Die Betrachtung verschiedener Tiere mit unterschiedlichem Gesundheitsstatus zeigt deutlich, welche Bereiche sich besonders stark verändern und demnach genauer zu betrachten sind. Die Partikelverteilungen bei gesunden Tieren (Abbildung 20) ist relativ gleichmäßig mit leicht abfallender Tendenz in Partikelzahl zu größeren Partikeln hin. Ab etwa einer Größe von 15 μm treten nur noch vereinzelt Partikel auf.

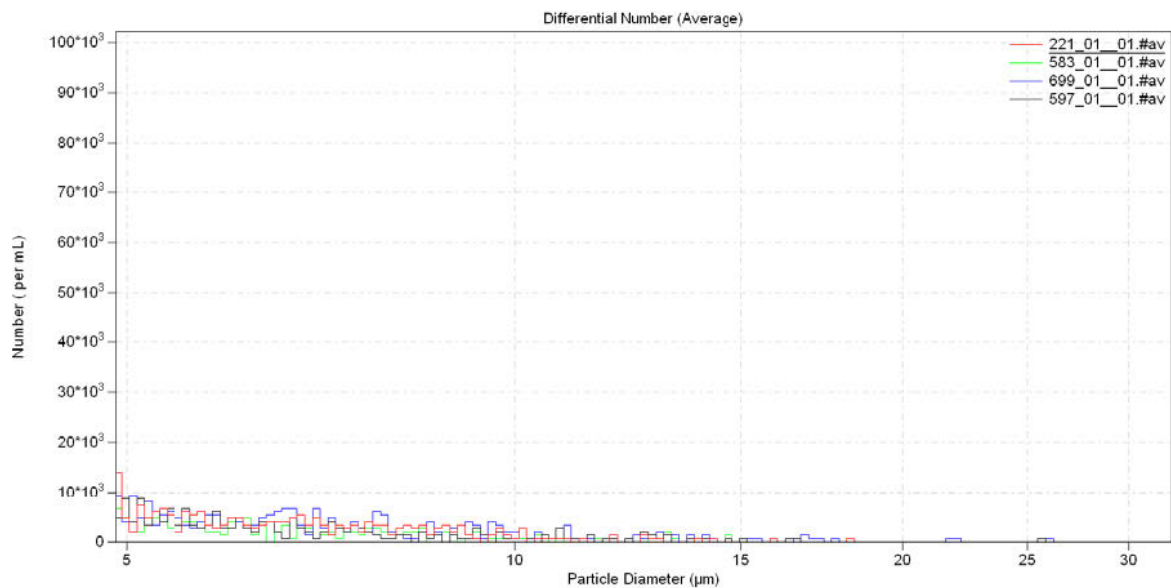


Abbildung 20: Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener gesunder Tiere

Bei der Milch subklinisch erkrankter Kühe zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren. Je nach Tier weichen die Kurven mehr oder weniger stark von denen gesunder Tiere ab. In Abbildung 21 ist beispielhaft die Partikelverteilungen vier verschiedener subklinisch erkrankter Tiere zu sehen.

Alle Kurven zeigen eine Erhöhung etwa zwischen 5 und 13 μm . Die Ausprägung ist jedoch sehr unterschiedlich. Bei zwei der Beispieltiere ist ein Doppelpeak mit einem Maximum bei etwa 7,1 μm und 10 μm zu sehen sowie einem Minimum bei etwa 8,4 μm . Auch bei der Kurve von Tier 710 ist dieser Doppelpeak zu erahnen, während das vierte Tier diese Besonderheit nicht zeigt. Auch die Betrachtung der anderen Kurven subklinisch erkrankter Tiere (hier nicht dargestellt) bestätigte, dass nicht zwangsläufig ein Doppelpeak zu erwarten ist.

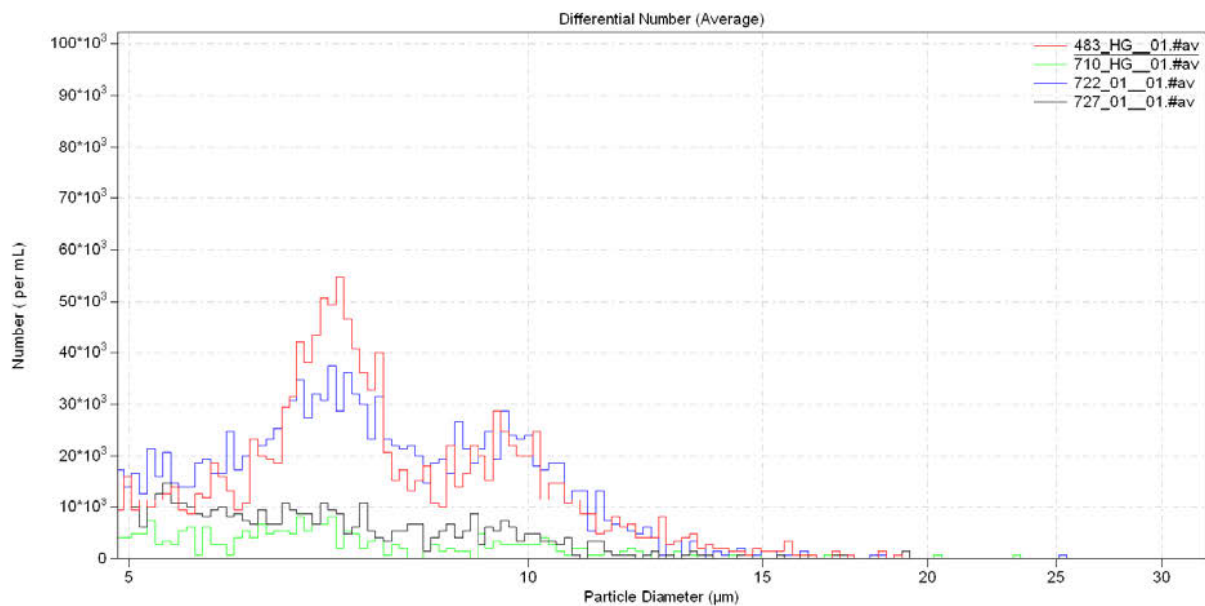


Abbildung 21: Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener subklinisch erkrankter Kühe

Abbildung 22 zeigt beispielhaft die Kurven von vier klinisch erkrankten Tieren. Alle Kurven zeigen trotz unterschiedlich starker Ausprägung einen deutlichen Peak im Bereich zwischen etwa 6,5 μm bis 11 μm Partikelgröße. Der Hauptbereich des Peaks befindet sich zwischen 7,5 μm und 9,5 μm .

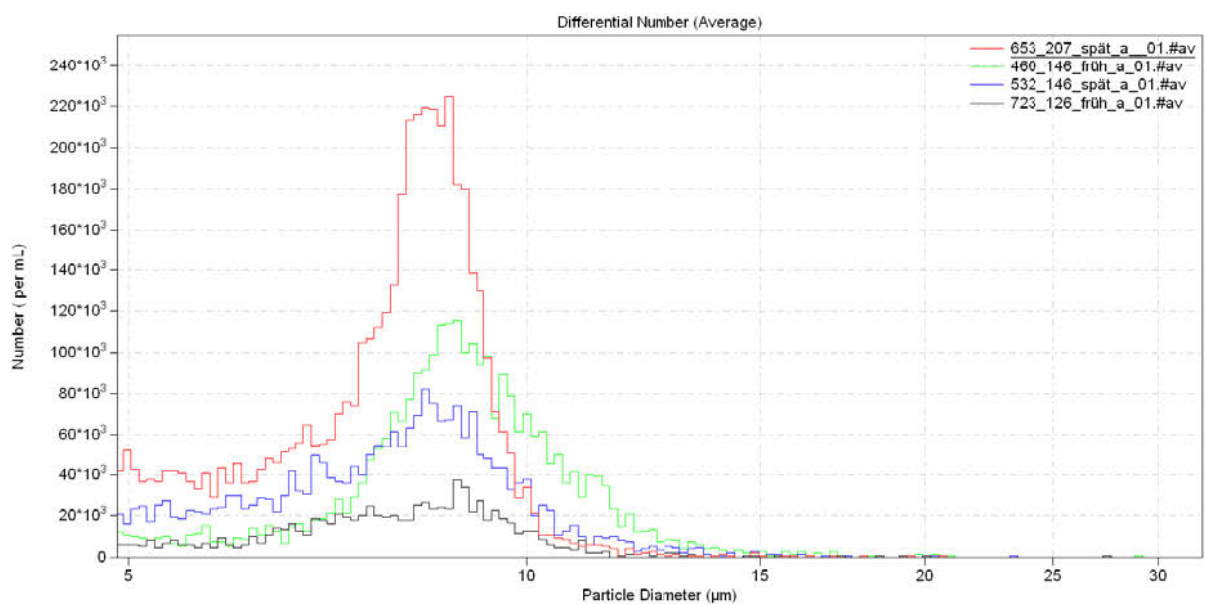


Abbildung 22: Partikelgrößenverteilung der Milch verschiedener klinisch an Mastitis erkrankter Kühe

Aus dieser Auswertung wurden Bereiche ermittelt, welche für die Krankheitserkennung besonders aussagekräftig sein könnten. Diese Bereiche wurden statistisch ausgewertet und leicht variiert, bis die bestmögliche Unterscheidung des Gesundheitsstatus erreicht wurde (vergleiche Kapitel 3.2.3.2). Tabelle 12 zeigt die Signifikanzen für die multiplen Vergleiche zur Unterscheidung des Gesundheitsstatus anhand der ausgewählten Bereiche auf.

Tabelle 12: Signifikanzen für die Unterscheidung der verschiedenen Gesundheitsstatus anhand der ausgewählten Partikelgrößenbereiche

Status	Status	Least square means	T Wert
<i>gesund</i>	<i>krank</i>	2,9694 ±0,1659	<0,0001
<i>gesund</i>	<i>subklinisch erkrankt</i>	1,2934±0,1745	<0,0001
<i>krank</i>	<i>Subklinisch erkrankt</i>	-1,6760±0,1265	<0,0001

Aus dieser Betrachtung ergaben sich drei Bereiche, welche für die Krankheitserkennung besonders relevant sind:

- Vorderer kritischer Bereich: 5,5 µm bis 6,5 µm
- Mittlerer kritischer Bereich: 7,5 µm bis 9,5 µm
- Hinterer kritischer Bereich: 10 µm bis 12 µm

Diese Bereiche wurden im Folgenden in Kombination mit der Gesamtpartikelzahl für die Erkennung des Gesundheitsstatus genutzt. In Abbildung 23 sind diese, als besonders zur Unterscheidung von gesunden, kranken und subklinisch erkrankten Tieren, geeigneten Bereiche noch einmal grafisch dargestellt.

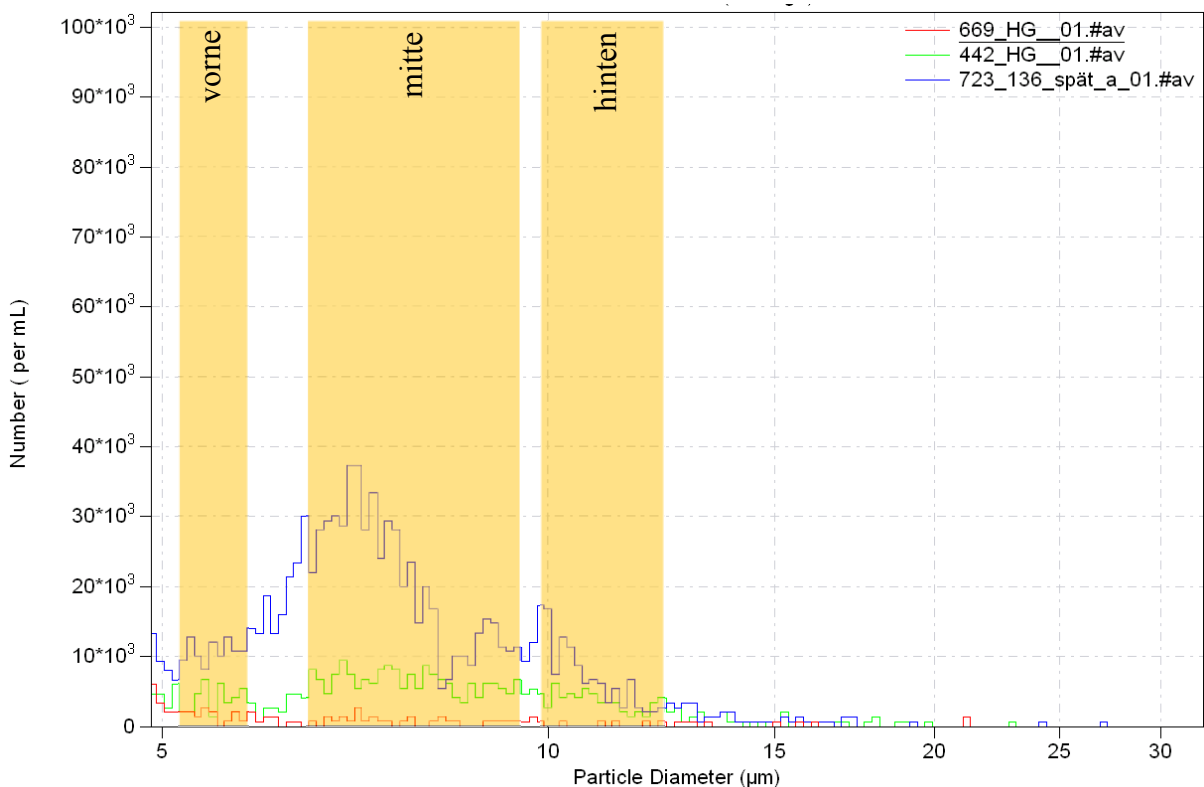


Abbildung 23: Grafische Darstellung der drei kritischen Bereiche mit den Kurven drei verschiedener Kühe unterschiedlichen Gesundheitszustand (rot- gesund, grün subklinisch erkrankt, blau- krank)

Zur Ermittlung der Zuverlässigkeit der Messungen des Coulter Counters wurden Doppelbestimmungen der Gesamtpartikelzahl analysiert. Hierbei fielen einige Ausreißerwerte auf, welche im Vergleich zum SCC (Fossomatic™ 5000) und der zweiten Bestimmung nicht nachvollziehbar hoch waren. Es wird hier davon ausgegangen, dass es sich um ein Problem mit Fettrückständen handelt. Diese Werte mit einer Abweichung von über 500.000 Zellen/ml zwischen Probe A und B wurden aus der Betrachtung ausgeschlossen. Bei der Abweichung zwischen A und B Probe ist nicht der Absolutwert von Bedeutung, sondern der Betrag. Daraus ergab sich ein Median der Abweichung von 20.000 Zellen/ml. In Tabelle 13 ist die Verteilung der Werte dargestellt.

Die Abweichungen zwischen den A- und B-Proben sind im Mittel relativ gering und mit den Abweichungen der Fossomatic™ 5000 vergleichbar. Die Spannweite ist jedoch bei den Ergebnissen des Coulter Counters höher. Auffällig waren die Ausreißerwerte mit Abweichungen über 500.000 Zellen/ml. Hierbei fiel jedoch auf, dass ein Wert zu dem mittels

Fossomatic™ 5000 ermittelten SCC passte und die große Abweichung damit auf einen Ausreißer zurück zu führen war.

Tabelle 13: Kennzahlen für die Doppelbestimmungen der Partikelzahlen im Coulter Counter

	Minimum	25%-Quantil	Median	75%-Quantil	Maximum
Zellen *10 ³ /ml	0,0001	10,6666	20,0000	64,6666	371,3331

4.3.3 Ermittlung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren

Aus der Analyse des Trainingsdatensatzes ergaben sich verschiedene Algorithmen, welche es in einer mehrparametrischen Analyse ermöglichen den Milchproben einen Gesundheitsstatus zuzuordnen.

Im ersten Schritt wurden Tiere als krank klassifiziert, deren Quotient zwischen dem mittleren kritischen Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QMG) bei einem Wert von größer oder gleich 0,37 liegt. Tiere mit einem Quotienten unter 0,37 werden als subklinisch erkrankt oder gesund eingeordnet (Abbildung 24).

Im zweiten Schritt wurden die Tiere, deren Quotient zwischen dem vorderen kritischen Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QVG) über einem Wert von 0,195 lag als gesund eingeordnet, Tiere mit einem Wert kleiner 0,195 als subklinisch oder klinisch erkrankt (Abbildung 24).

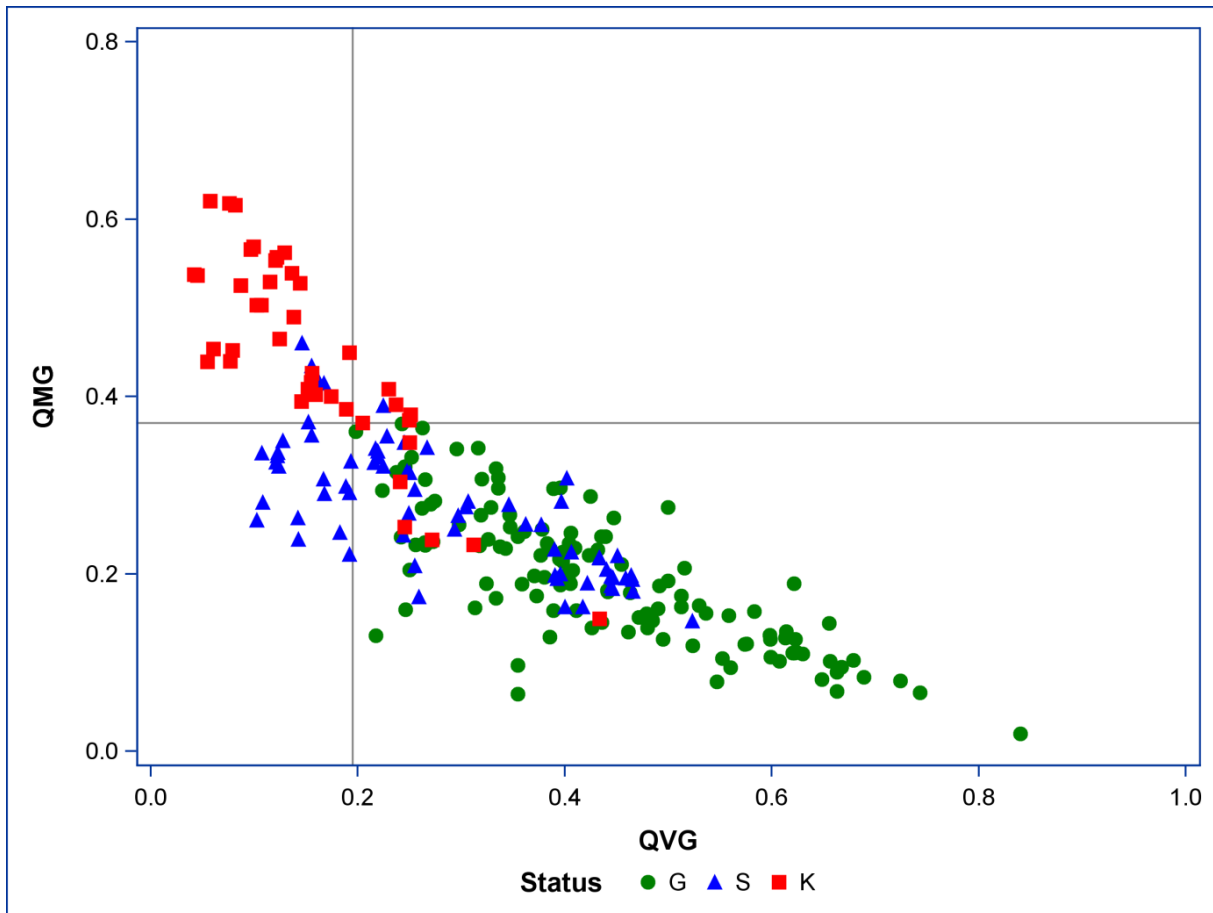


Abbildung 24: Schritt 1 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, kritischer Wert für kranke Tiere bei einem Wert von $\geq 0,37$ für den Quotienten zwischen dem mittleren Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QMG)

Schritt 2 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, kritischer Wert für gesunde Tiere bei einem Wert von $\geq 0,195$ für den Quotienten zwischen dem vorderen Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QVG)
(Quadrate, rot – krank „K“, Kreise, grün- gesund „G“, Dreiecke, blau- subklinisch erkrankt „S“)

Der dritte Schritt dient zur Unterscheidung der subklinisch erkrankten Tiere von den gesunden und den kranken (Abbildung 25). Hierfür wurde die QMG Werte über dem dekadischen Logarithmus der Gesamtpartikelzahl (LG) aufgetragen. Durch folgende Funktionen ist es möglich, die subklinisch erkrankten Tiere von den anderen zu unterscheiden. Die Obergrenze wird hierbei definiert durch:

$$QMG = -0,25 \times LG + 1,14.$$

Die untere Grenze ergibt sich aus folgender Funktion:

$$QMG = -0,25 \times LG + 0,825.$$

Tiere zwischen Ober- und Untergrenze wurden als subklinisch erkrankt klassifiziert. Bei Überschreiten der Obergrenze werden die Tiere als krank klassifiziert, bei Unterschreiten der Untergrenze als gesund.

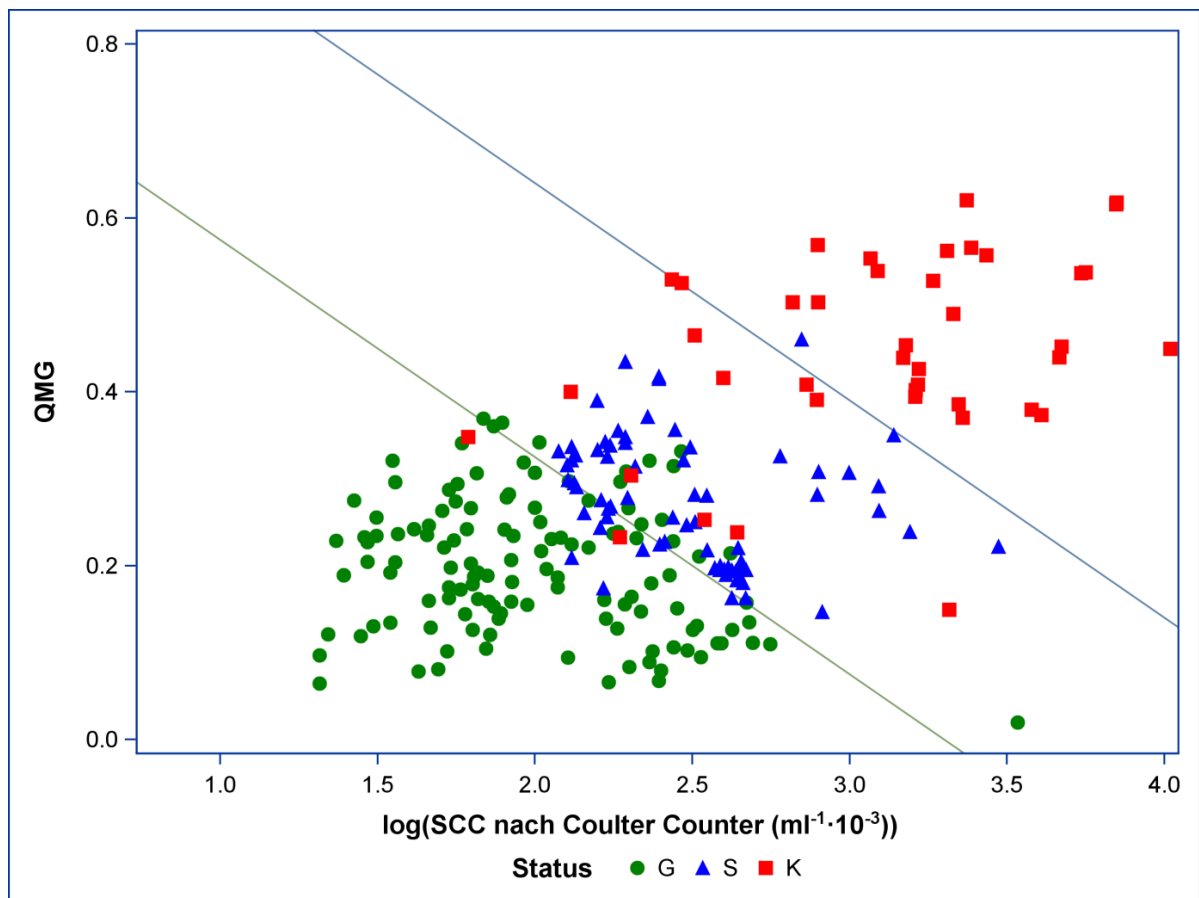


Abbildung 25: Schritt 2 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, anhand des Quotienten zwischen dem mittleren Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QMG) aufgetragen über dem dekadischen Logarithmus der Gesamtpartikelzahl
(Quadrate, rot – krank „K“, Kreise, grün- gesund „G“, Dreiecke, blau- subklinisch erkrankt „S“)

Zum Vierten (Abbildung 26) wurde der QVG über dem LG aufgetragen und als Obergrenze:

$$QVG = 0,42 \times LG - 0,6$$

definiert und als Untergrenze:

$$QVG = 0,42 \times LG - 0,9.$$

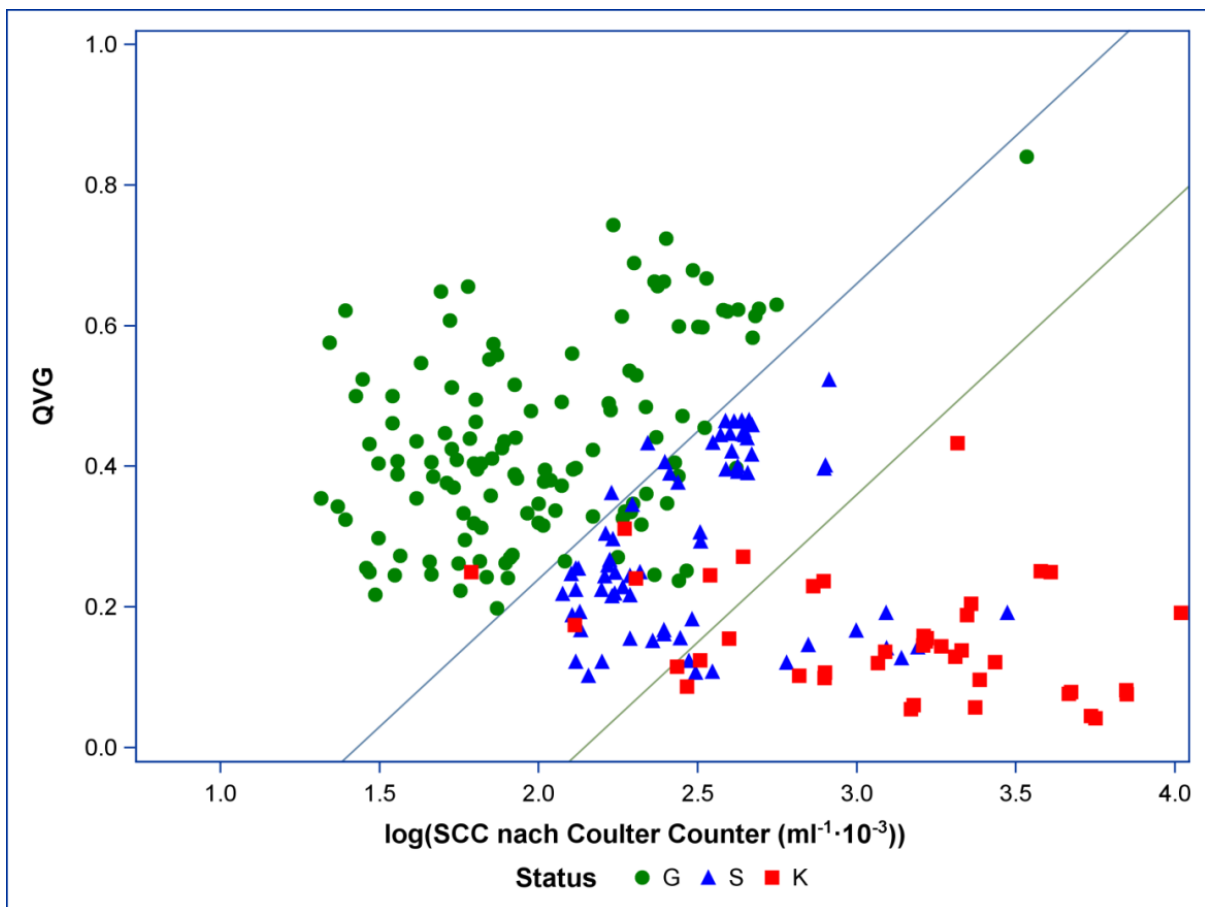


Abbildung 26: Schritt 4 zur Identifizierung des Gesundheitsstatus, anhand des Quotienten zwischen dem vorderen Bereich und der Gesamtpartikelzahl (QVG) aufgetragen über dem dekadischen Logarithmus der Gesamtpartikelzahl (Quadrate, rot – krank „K“, Kreise, grün- gesund „G“, Dreiecke, blau- subklinisch erkrankt „S“)

Durch diese Auftragung ist es möglich, den Großteil der subklinisch erkrankten Tiere aus der Gruppe der gesunden Tiere auszusondern. Die Tiere, die zwischen den Funktionen liegen, werden als subklinisch erkrankt klassifiziert. Tiere, welche unter der Untergrenze liegen, als krank (Abbildung 26).

Die Analyse des Trainingsdatensatzes mit insgesamt 237 Proben zeigte, dass es anhand der kritischen Bereiche möglich ist, den Gesundheitsstatus zu ermitteln. Tabelle 14 zeigt, wie die Proben im Vergleich zu dem tatsächlichen Gesundheitsstatus der Kuh von dem entwickelten System eingeordnet wurden.

Tabelle 14: Proben des Trainingsdatensatzes mit ihrem tatsächlichen Zugehörigkeit zu einem Gesundheitsstatus, zugeordnet zur Einteilung nach der entwickelten Prozedur

Klassifizierung	Tatsächlicher Gesundheitsstatus		
	<i>gesund</i>	<i>subklinisch erkrankt</i>	<i>akut erkrankt</i>
<i>gesund</i>	109	2	1
<i>subklinisch erkrankt</i>	17	67	10
<i>akut erkrankt</i>	0	1	30

Tabelle 15 zeigt die Kennzahlen zur Bewertung des entwickelten Systems zur Erkennung des Eutergesundheitsstatus aus einer Milchprobe für den vorhandenen Trainingsdatensatz.

Tabelle 15: Kennzahlen bei der Erkennung des Eutergesundheitsstatus für den Trainingsdatensatz

	Sensitivität	Fehlerrate	Spezifität
<i>gesund</i>	86,5 %	2,7 %	97,3 %
<i>subklinisch erkrankt</i>	95,7 %	28,7 %	83,8 %
<i>akut erkrankt</i>	73,1 %	3,2 %	99,5 %

Für den Testdatensatz ergaben sich anhand der entwickelten Klassifikation die in Tabelle 16 dargestellten Werte. Die Kennzahlen für die Güte der Klassifikation im Testdatensatz sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Proben des Testdatensatzes mit ihrer tatsächlichen Zugehörigkeit zu einem Gesundheitsstatus, zugeordnet zur Einteilung nach der entwickelten Prozedur

Klassifizierung	Tatsächlicher Gesundheitsstatus		
	<i>gesund</i>	<i>subklinisch erkrankt</i>	<i>akut erkrankt</i>
<i>gesund</i>	59	0	0
<i>subklinisch erkrankt</i>	1	13	1
<i>akut erkrankt</i>	0	7	3

Tabelle 17: Kennzahlen bei der Erkennung des Eutergesundheitsstatus für den Testdatensatz

	Sensitivität	Fehlerrate	Spezifität
<i>gesund</i>	98,3 %	0 %	100 %
<i>subklinisch erkrankt</i>	65,0 %	13,3 %	96,9 %
<i>akut erkrankt</i>	75,0 %	70 %	91,2 %

4.3.4 Partikelgrößenverteilung in der Milch während einer Mastitis

Die Untersuchung der Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Erkrankung an den Beispielen dreier verschiedener Kühe zeigte zum Einen eine Veränderung im Laufe der Erkrankung und zum Zweiten Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Beispielhaft sind in den Abbildungen 27 bis 39 die Krankheitsverläufe dreier Tiere dargestellt. Verglichen werden hierbei jeweils die Partikelgrößenverteilungen derselben Melkung in Bezug auf den

Zeitpunkt der Krankheitsdiagnose. Da nicht von allen Tieren kontinuierlich bei jeder Melkung Proben genommen werden konnten und die Tiere zudem unterschiedlich lange erkrankt waren, sind nicht in allen Abbildungen alle drei Beispieltiere dargestellt. Die jeweiligen Untersuchungsdaten weichen aus diesem Grunde voneinander ab. In allen folgenden Abbildungen ist Kuh Nummer 455 als rote Kurve dargestellt, Kuh 221 als grüne Kurve und Kuh 723 als blaue Kurve. In Fällen, in denen nicht für alle Tiere Proben vorlagen, wurde die Kurve vom Hintergrund „Isoton“ als Platzhalter eingefügt, um die Reihenfolge und Farbkennzeichnung der Tiere beizubehalten.

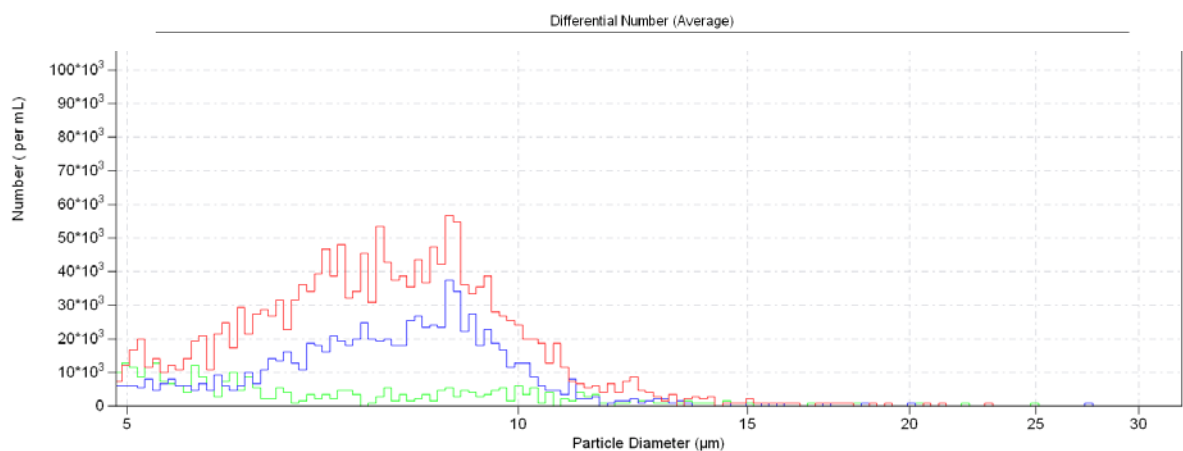


Abbildung 27: Partikelgrößenverteilung der Melkung 1 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)

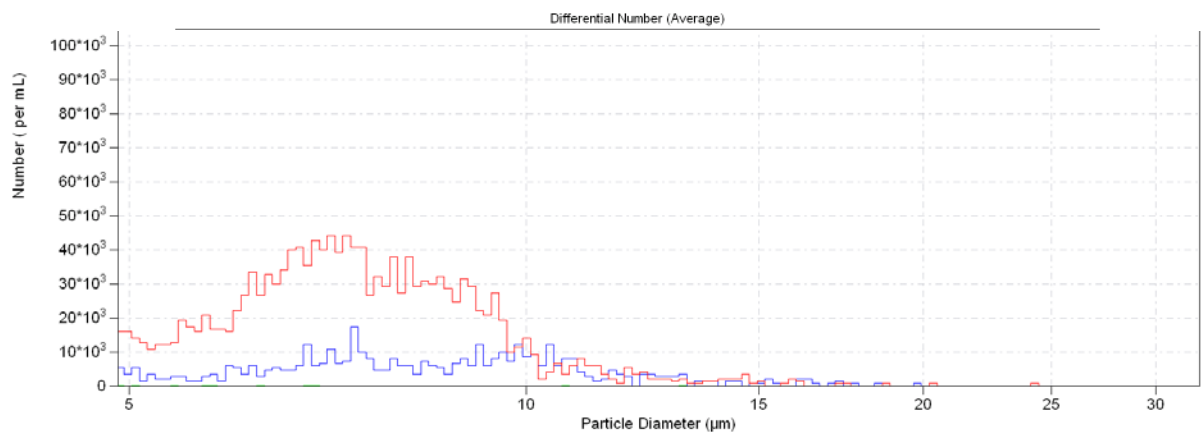


Abbildung 28: Partikelgrößenverteilung der Melkung 2 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)

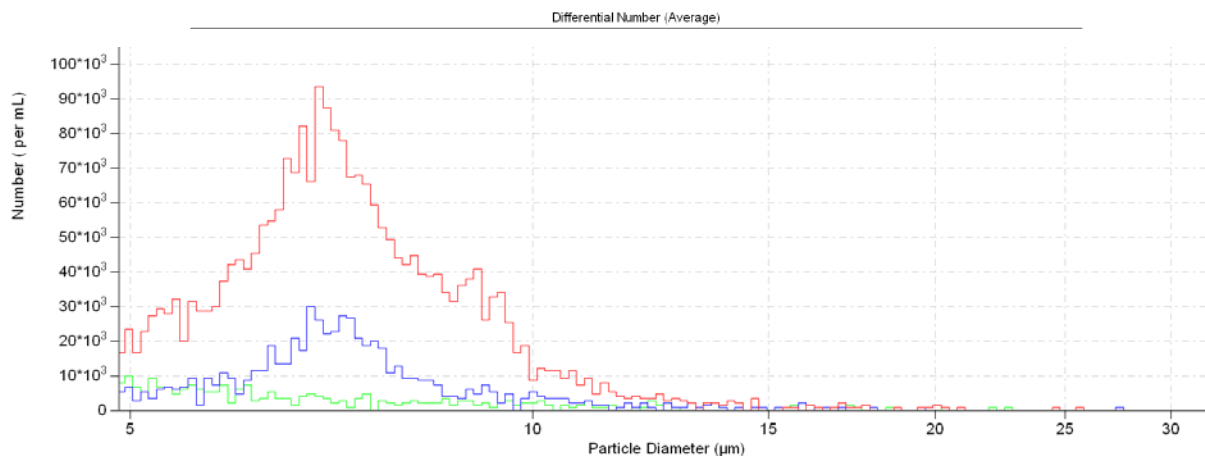


Abbildung 29: Partikelgrößenverteilung der Melkung 3 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)

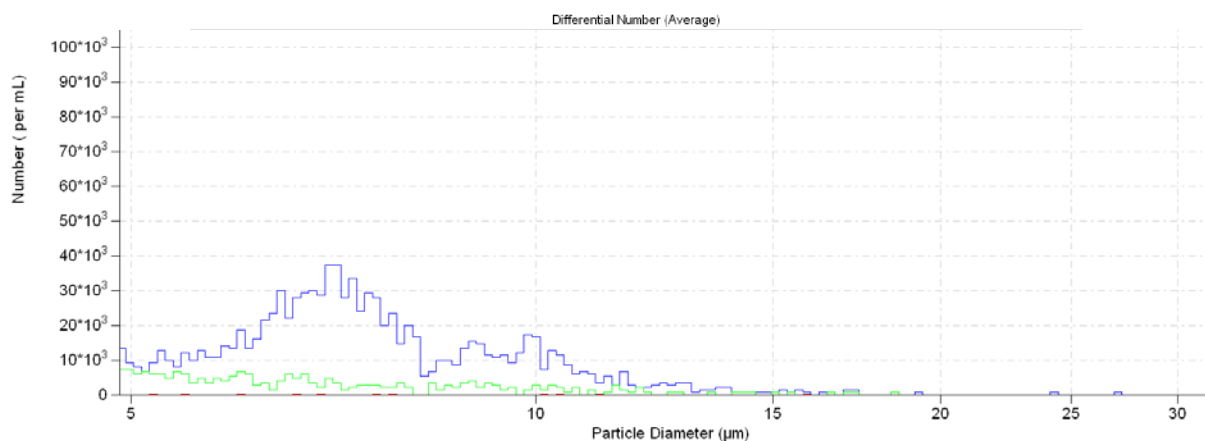


Abbildung 30: Partikelgrößenverteilung der Melkung 4 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)

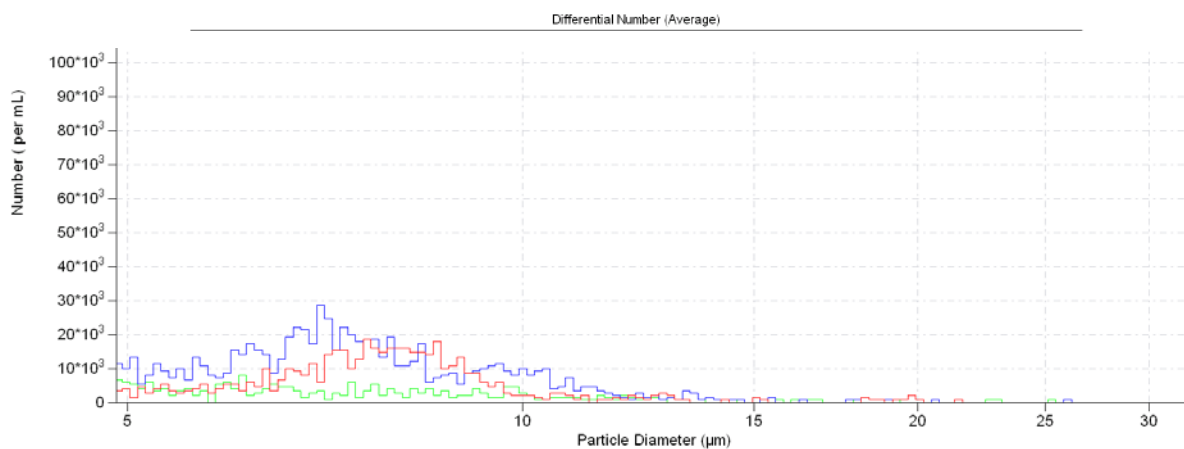


Abbildung 31: Partikelgrößenverteilung der Melkung 5 der Tiere 455 (rot), 221 (grün) und 723 (blau)

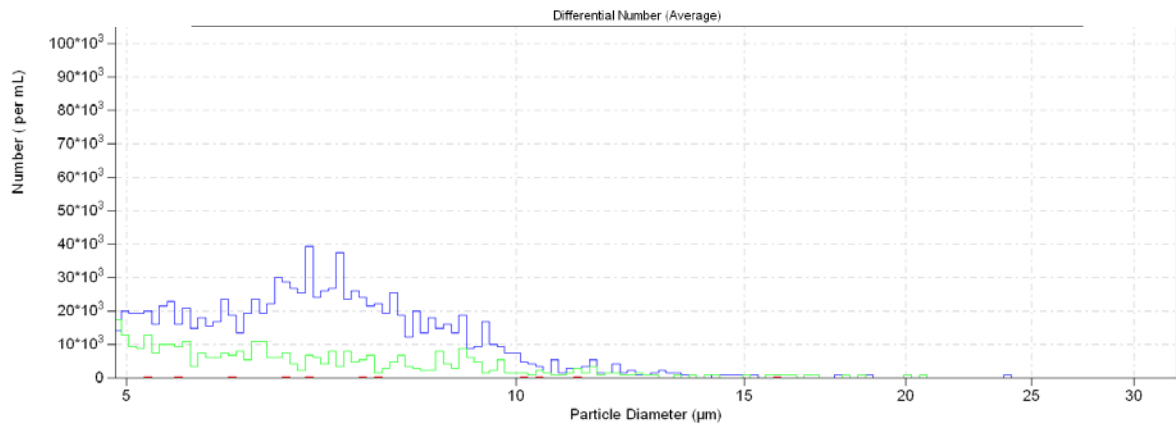


Abbildung 32: Partikelgrößenverteilung der Melkung 6 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)

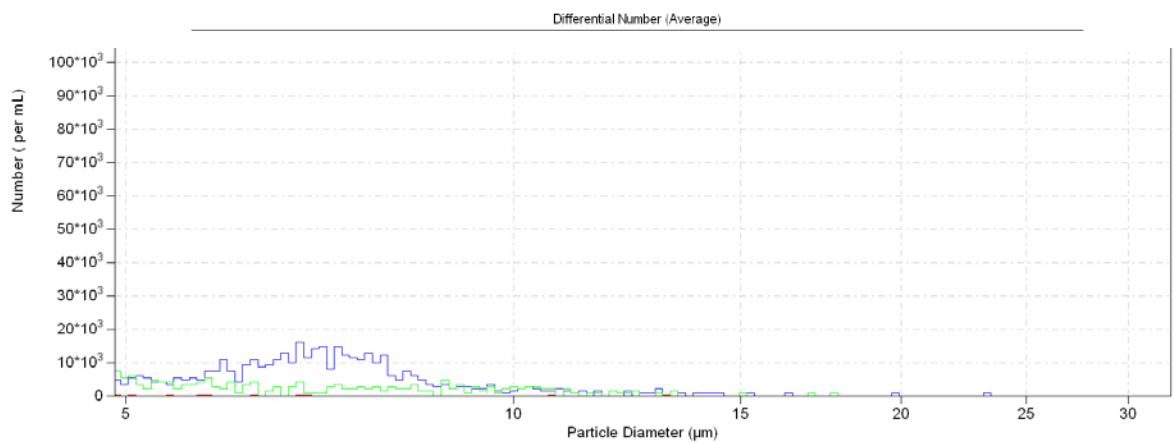


Abbildung 33: Partikelgrößenverteilung der Melkung 7 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)

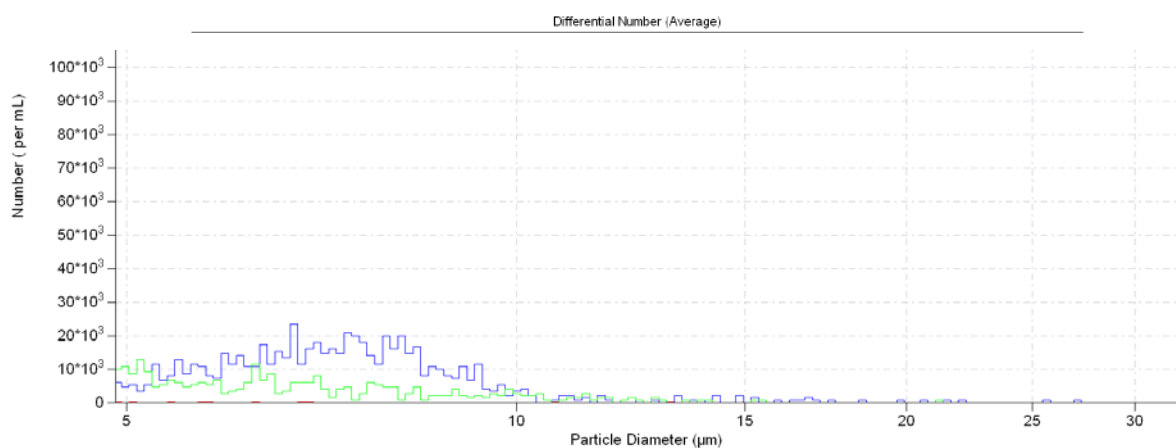


Abbildung 34: Partikelgrößenverteilung der Melkung 8 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)

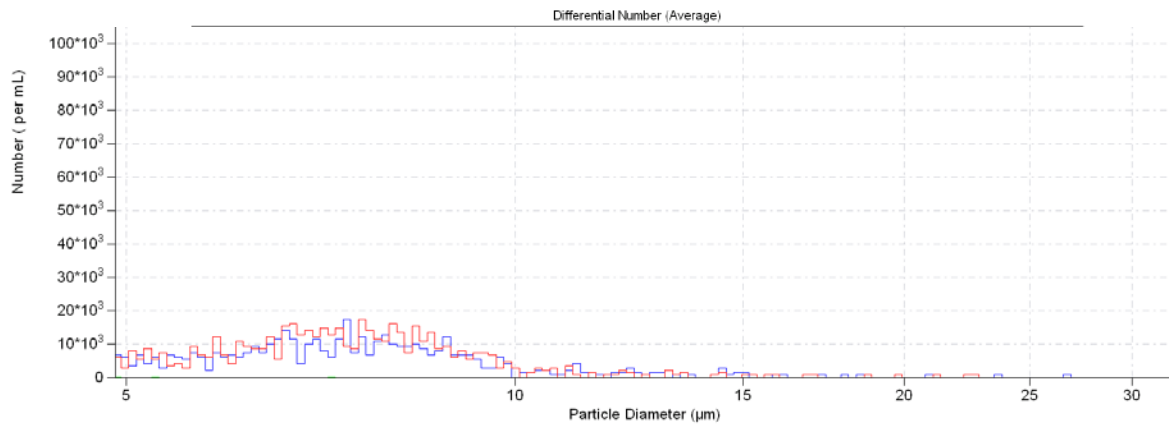


Abbildung 35: Partikelgrößenverteilung der Melkung 9 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)

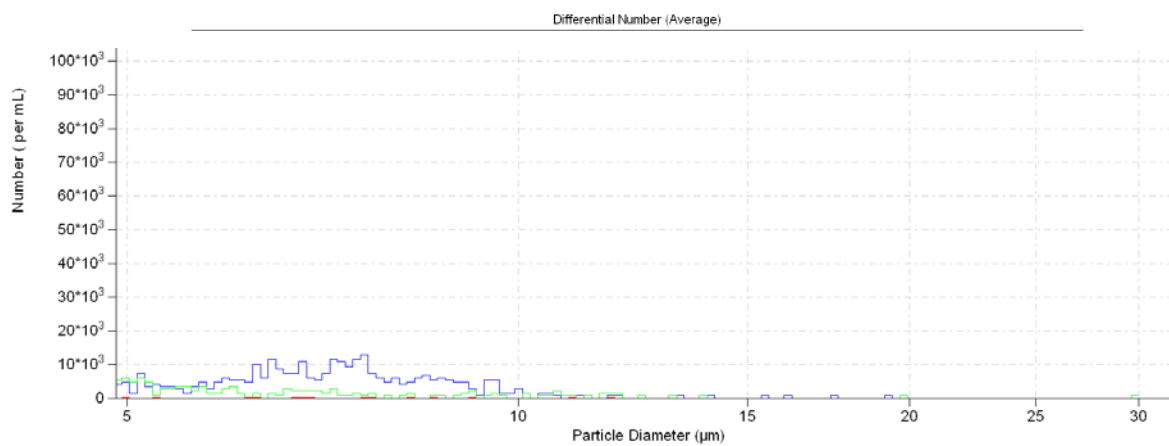


Abbildung 36: Partikelgrößenverteilung der Melkung 10 der Tiere 221 (grün) und 723 (blau)

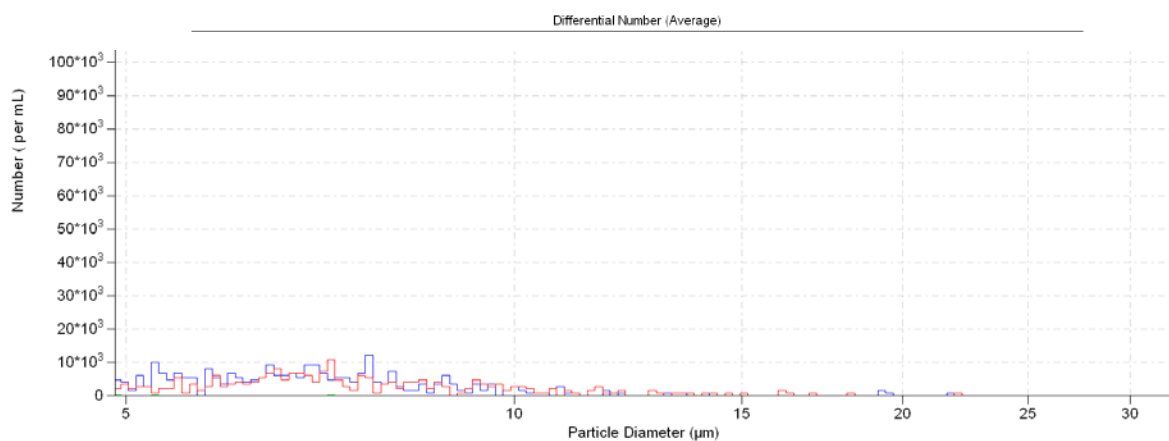


Abbildung 37: Partikelgrößenverteilung der Melkung 11 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)

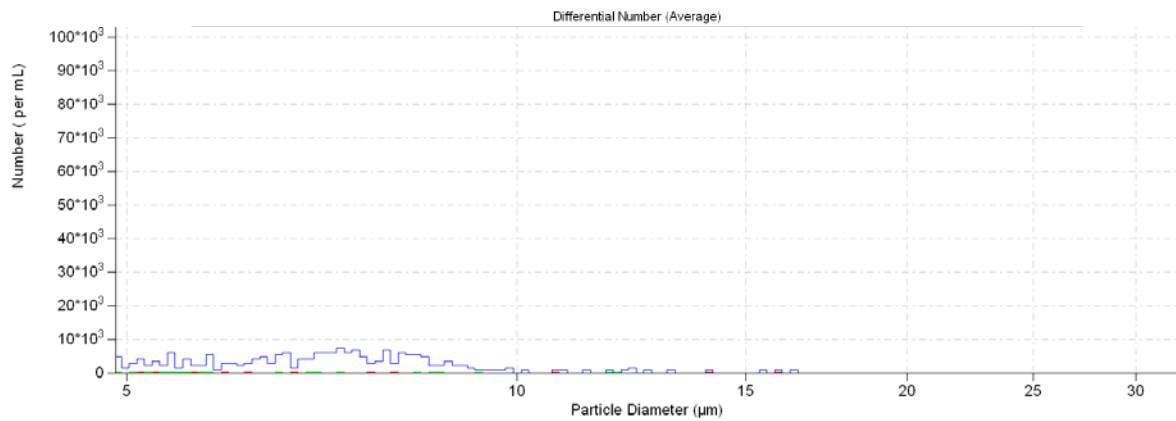


Abbildung 38: Partikelgrößenverteilung der Melkung 12 des Tieres 723 (blau)

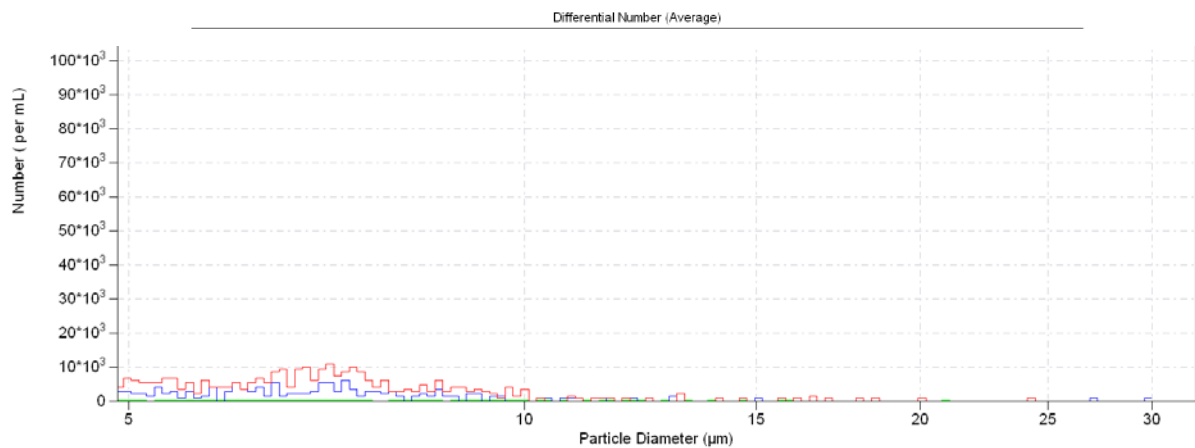


Abbildung 39: Partikelgrößenverteilung der Melkung 13 der Tiere 455 (rot) und 723 (blau)

Die Partikelgrößenverteilungen im Krankheitsverlauf machen deutlich, dass zu Beginn einer Mastitis der Peak im Bereich von 7,5 μm bis 9,5 μm besonders stark ausgeprägt ist. Hierbei sind jedoch deutliche Unterschiede in der Ausprägung des Peaks zwischen den Einzeltieren zu sehen. In den darauf folgenden Melkungen flacht der Peak ab und verschiebt sich marginal zu größeren Partikelgrößen. Dieser Trend hält jedoch nicht durchgängig an. Tabelle 18 zeigt den SCC ermittelt mit der FossomaticTM 5000 für die drei Tiere über den Krankheitsverlauf.

Tabelle 18: Zellzahlen der Tiere 455, 221 und 723 im Krankheitsverlauf mittels Fossomatic™ 5000 bestimmt

Tier	455	221	723
Melkung	Zellen*10 ³ /ml		
1	2574	1304	3820
2	2303		1774
3	3598	501	3191
4		427	2264
5	1088	368	1388
6		455	1182
7		132	732
8		164	582
9	430		427
10		79	448
11	209		288
12			227
13	177		124

Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die Partikelgrößenverteilungen der Tiere 393 und 455. Es sind jeweils zwei Melkungen mit einer niedrigen Zellzahl dargestellt und die zwei darauffolgenden mit einer hohen Zellzahl. In den Tabellen 19 und 20 sind die Zellzahl (Fossomatic™ 5000), die Partikelzahlen für die kritischen Bereiche Vorne und Mitte, die Quotienten QVG und QMG sowie der Status, der durch das System zugeordnet wurde, dargestellt.

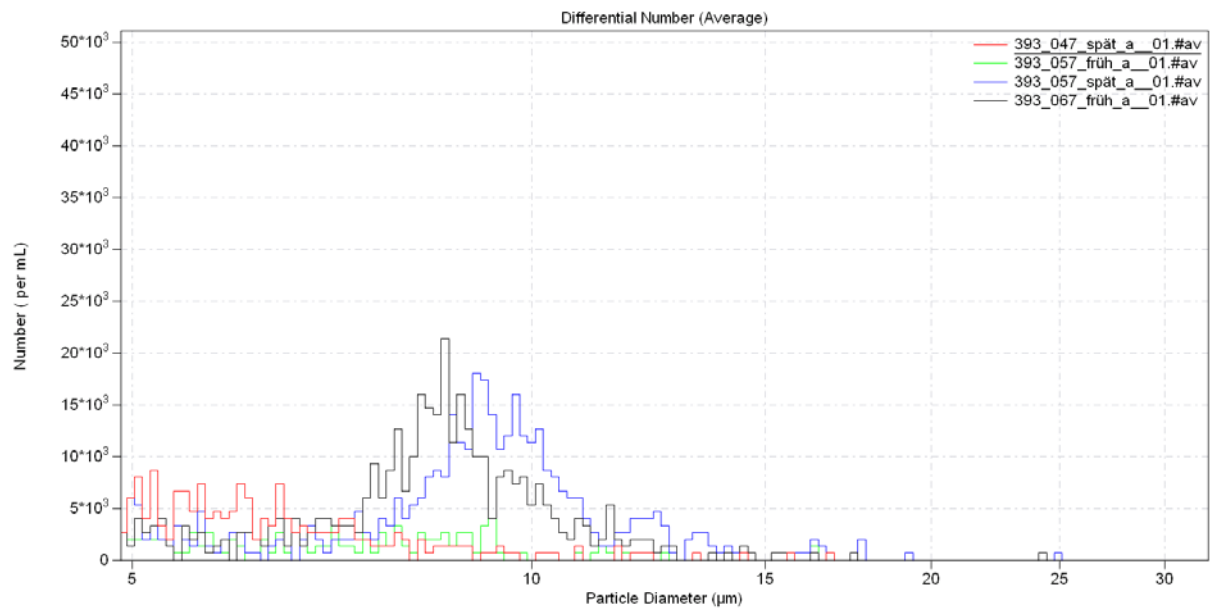


Abbildung 40: Partikelgrößenverteilung von Kuh 393 bei vier aufeinanderfolgenden Melkungen mit unterschiedlichem SCC (Melkung 1: rot, Melkung 2: grün, Melkung 3: blau, Melkung4: schwarz)

Tabelle 19: Kennzahlen Partikelgrößenverteilung von Kuh 393

	SCC Foss in 10 ³ /ml	Vorne in 10 ³ /ml	Mitte in 10 ³ /ml	QVG	QMG	Status
		a/b	a/b	a/b	a/b	a/b
4.7. spät	93	45/22	15/17	0,50/0,31	0,16/0,23	g/g
5.7. früh	53	8/7	29/19	0,15/0,16	0,55/0,40	s/k
5.7. spät	637	10/7	145/149	0,03/0,02	0,45/0,49	s/s
6.7. früh	794	14/32	185/285	0,05/0,07	0,60/0,61	k/k

(Status: g: gesund, s: subklinisch erkrankt, k: krank)

Bei der Partikelgrößenverteilung von Kuh 393 ist sehr auffällig, dass die Zellzahl bei der Melkung vor dem erneuten Zellzahlanstieg (5.7. früh) zwar insgesamt geringer ist als bei der Melkung zuvor, die kritischen Bereiche aber schon eine Tendenz zu einer Erkrankung

anzeigen. So ist die Partikelzahl im mittleren kritischen Bereich bei dieser Melkung schon höher als die im vorderen kritischen Bereich, so wie es auch beim Krankheitsausbruch der Fall ist. Bei der ersten aufgeführten Melkung hingegen ist es noch anders herum. Von der Melkung am „4.7. spät“ zum „5.7. früh“ sinkt die Gesamtzellzahl um 40.000 Zellen/ml ab. Die Verhältnisse der kritischen Bereiche jedoch entwickeln sich schon in die Richtung, wie sie bei einer Erkrankung vorliegen. So ergibt das System zur Krankheitserkennung bei diesem Tier bei einer Zellzahl von nur 53.000 Zellen/ml den Eutergesundheitsstatus krank bzw. subklinisch erkrankt. In der darauffolgenden Melkung ist die Zellzahl stark angestiegen. Das System hat hier schon vor einem Anstieg der Zellzahl eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung und des Gesundheitsstatus registriert.

Die Partikelgrößenverteilung von Kuh 455 ist weniger auffällig, als die der Kuh 393. Die Entwicklung zu einer Partikelgrößenverteilung, wie sie bei einer Mastitis charakteristisch ist, ist in der Melkung vor dem erneuten Zellzahlanstieg nicht zu sehen. So ergibt das System zur Krankheitserkennung hier auch nur bei einer der Doppelbestimmungen, dass Milch eines nicht gesunden Tieres vorliegt. Danach wurde das Tier jedoch richtig als krank klassifiziert.

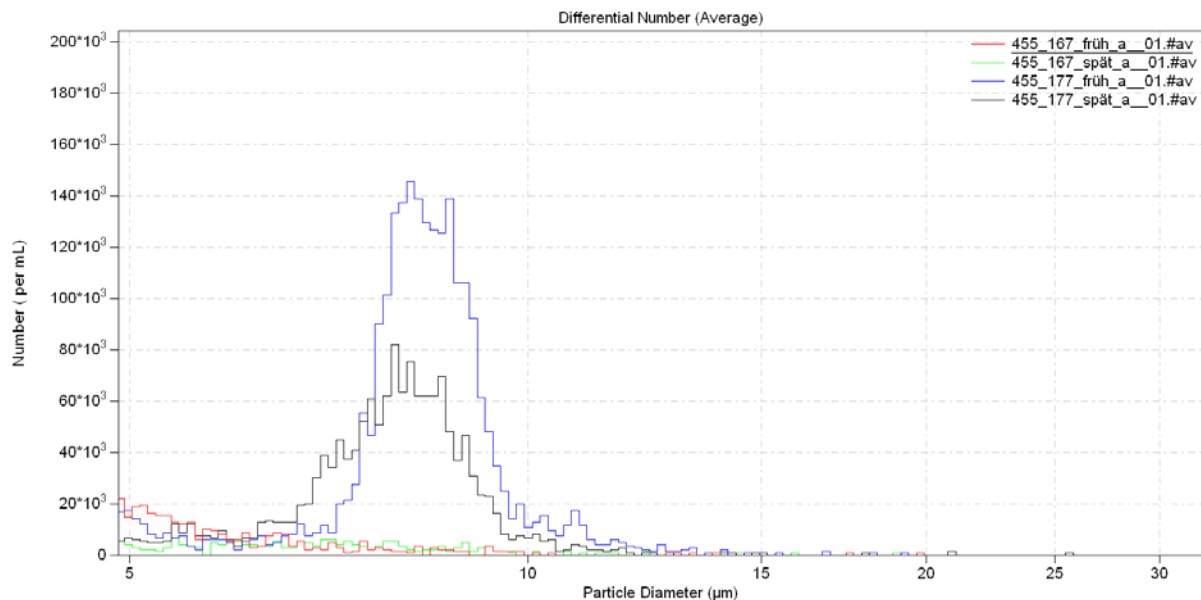


Abbildung 41: Partikelgrößenverteilung von Kuh 455 bei vier aufeinanderfolgenden Melkungen mit unterschiedlichem SCC

Tabelle 20: Kennzahlen Partikelgrößenverteilung von Kuh 455

	SCC Foss in 10³/ml	Vorne in 10³/ml	Mitte in 10³/ml	QVG	QMG	Status
		a/b	a/b	a/b	a/b	a/b
<i>16.7. früh</i>	74	58/11	1/3	0,59/0,21	0,17/0,39	g/k
<i>16.7. spät</i>	109	18/17	3/3	0,21/0,24	0,36/0,36	s/g
<i>17.7. früh</i>	3723	32/39	104/88	0,01/0,02	0,82/0,83	k/k
<i>17.7. spät</i>	1625	103/103	41/35	0,07/0,07	0,63/0,62	k/k

(Status: g: gesund, s: subklinisch erkrankt, k: krank)

Trotz eines geringen SCC konnten bei einem Tier beide Proben direkt vor dem erneuten Anstieg des SCC als Milch eines erkrankten Tieres identifiziert werden. Bei dem zweiten Tier gab eine der zwei Proben einen Hinweis auf ein Krankheitsgeschehen.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der Probenaufbereitung

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Bedeutung der Probenaufbereitung, die von einigen Autoren (Dulin et al, 1982; Schröder, 2003) geschildert wird, bestätigen. Hierbei ist zum einen die Praktikabilität für die spätere Einsetzbarkeit bedeutsam und zum anderen der Einfluss auf das spätere Ergebnis.

Im früheren IDF-Standard 148 (IDF, 1991) von 1991 ist die Methode der Zellzählung mittels Coulter Counter noch beschrieben, während sie im überarbeiteten Standard (IDF, 2006) nicht mehr beschrieben ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die aufwändige Aufbereitungsprozedur der Probe sein, welche nach der beschriebenen Vorschrift mehr als einen Tag in Anspruch nimmt. Durch die lange und aufwändige Aufbereitungsprozedur ist die Methode zur Nutzung als Diagnosetool für Eutergesundheitsstörungen nicht praktikabel. Die in dieser Arbeit beschriebene Probenaufbereitung nimmt nur wenige Minuten in Anspruch. So konnte mit einer Zentrifugationsdauer von 15 Minuten bei 4°C mittels Überkopfzentrifugation und der anschließenden Abtrennung der Fettschicht ein vergleichbares Ergebnis zu der im IDF Standard beschriebenen Aufbereitung erreicht werden. Die entwickelte Methode ist in der Genauigkeit der Methode nach IDF vergleichbar, in der Schnelligkeit und Eignung für die Praxis jedoch deutlich überlegen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen einiger Autoren, dass die Probenaufbereitung die späteren Ergebnisse beeinflussen, konnten auch hier belegt werden. So zeigten Dulin et al. (1982), dass nach einer Zentrifugation Zellen nicht nur im Zellpellet, sondern auch im Überstand und in der Fettschicht nachzuweisen sind. Auch in den vorliegenden Untersuchungen sind in allen drei Fraktionen Zellen nachweisbar. Die Anteile sind hierbei abhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Anteile der Zellen, die im Fett zurück bleiben und somit nicht weiter analysiert werden, größer sind, je geringer die Zentrifugationsgeschwindigkeit ist. So unterscheiden sich die Anzahl der Zellen im Fett und im Pellet mit Überstand bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $400 \times g$ nicht signifikant voneinander. Dies heißt, dass etwa die Hälfte der Zellen verloren geht. Betrachtet man in Vergleich die Zentrifugationsprotokolle, die viele Autoren für die Aufbereitung der Milchproben zur Zelldifferenzierung nutzen, findet man häufig Geschwindigkeiten unter $400 \times g$ (Dulin et al., 1982; Leitner et al., 2000b; Miller et al., 1991;

Pilla et al., 2012; Schwarz et al., 2011b). Es zeigte sich in den eigenen Untersuchungen, dass bis zu einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $1600 \times g$ der Zellgehalt in der Fettfraktion mit steigender Geschwindigkeit signifikant sinkt. Um einen möglichst geringen Verlust an messbaren Zellen zu erreichen, ist also eine Zentrifugation von $1600 \times g$ nötig. Eine weitere Erhöhung zeigte keine weitere Reduktion der Zellen im Fett. In der Literatur finden sich jedoch kaum Angaben einer vergleichbaren Zentrifugationsgeschwindigkeit. Lediglich Merle et al. (2007) und Olde Riekerink et al. (2007) bereiten die Proben mit $1500 \times g$ bzw. $1516 \times g$ mit einer ähnlich hohen Zentrifugationsgeschwindigkeit wie in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, auf.

In der Literatur wird nach der Probenaufbereitung durch Zentrifugation bis auf wenige Ausnahmen (Olde Riekerink et al., 2007; Read Jr et al., 1967), welche zusätzlich zum Zellpellet auch den Überstand oder einen Teil davon analysieren, lediglich das entstandene Zellpellet analysiert. In den eigenen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Anzahl an Zellen, die im Überstand verbleiben, einen nicht unerheblichen Anteil bildet. Die Verteilung der Zellen zwischen Pellet und Überstand ist dabei von der Zentrifugationsgeschwindigkeit abhängig. Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $400 \times g$ ist der Anteil an Zellen im Überstand größer als im Zellpellet. Ab einer Geschwindigkeit von $800 \times g$ ist der Zellanteil im Pellet zwar höher als im Überstand, die im Überstand zurückbleibenden Zellen jedoch nicht vernachlässigbar. So gibt es bei nahezu allen Geschwindigkeiten einen Unterschied in der Zellzahl zwischen dem Zellpellet und der Mischung aus Zellpellet und Überstand. Auch eine Analyse, die sich nur auf das Zellpellet beschränkt, reduziert demnach den Anteil der analysierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einfluss der Probenaufbereitung auf die spätere Analyse gravierend ist. Gerade bei den häufig verwendeten Zentrifugationsprotokollen mit einer niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeit von unter $1600 \times g$ und der Beschränkung der folgenden Analyse auf das Zellpellet kann aufgrund der eigenen Untersuchungen geschlossen werden, dass in diesen Fällen nur ein Bruchteil der in der Rohmilchprobe vorhandenen Zellen analysiert wird. Andere Autoren widersprechen diesen Ergebnissen und nennen einen vernachlässigbar kleinen Anteil an Zellen in der Fettfraktion (Read Jr et al., 1967). Andere Studien hingegen kommen zu einem ähnlichen Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt (Dulin et al., 1982).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich bestimmte Zelltypen in den verschiedenen Fraktionen akkumulieren (Dulin et al., 1982; Schröder, 2003). Damit verfälscht eine unvollständige Nutzung der Fraktionen nicht nur die Gesamtpartikelzahl, sondern hat auch Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung, für deren Analyse der Coulter Counter nutzbar ist.

Bei der Nutzung des Pellets inklusive Überstand befanden sich, in den eigenen Untersuchungen, nach der üblichen Zentrifugation Fettrückstände im Überstand, die mittels MilkoScanTM FT kaum messbar sind, aber im Coulter Counter ein Problem darstellen und die Ergebnisse verfälschen. Wird, wie in vielen Untersuchungen, die in der Literatur zu finden sind lediglich das Zellpellet für die Analyse genutzt, entfällt diese Schwierigkeit. Aufgrund der Gesetze der Zentrifugation, dass schwerere Bestandteile stärker vom Zentrum weggeschleudert werden, als leichte, ergibt sich eine Schichtung von Zellpellet als am weitesten vom Zentrum entfernten Fraktion, dem wässrigen Überstand in der Mitte und dem Fett als der dem Mittelpunkt nächster Fraktion. Damit bildet der Überstand eine Trennschicht zwischen Zellpellet und Fett. Im Zellpellet bleibt kaum Fett zurück und es kommt auch durch den Überstand als Trennschicht zu keiner erneuten Durchmischung von Fett und Pellet. Dies zeigten die eigenen Untersuchungen selbst für niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeiten. Die Lösung hierfür, um dennoch sowohl die Pellet- als auch die Überstandsfraktion nutzen zu können war die Zentrifugation über Kopf. Dadurch kam es bei der Abtrennung des Fetts zu keinem Eintrag kleinster Fettmengen in den Überstand, was hingegen beim Abspateln stets der Fall war. Bei den Zentrifugationsgefäßen für die Überkopfzentrifugation ist darauf zu achten, dass der Deckel nicht aus porösem Plastik besteht, da das Zellpellet sonst schwer zu resuspendieren ist. Durch die Überkopfzentrifugation ist es erstmals möglich, die Milchproben so für den Coulter Counter aufzubereiten, dass zum einen keine zellhaltigen Fraktionen unnötig verworfen werden und zudem eine ausreichende Fettabtrennung auch im Überstand erfolgen kann. Auch in der IDF-Methode (IDF, 1991) wurden diese beiden Ziele erreicht, jedoch nur mit erheblichem Zeitaufwand und dem Zusatz von Chemikalien. Beides ist für die hier entwickelte Methode nicht nötig. Somit bietet die entwickelte Methode die Möglichkeit einer zeitnahen Analyse der Milchprobe nach der Probennahme. Gegebenenfalls ist auch eine Nutzung im automatisierten Praxiseinsatz möglich.

Die Entwicklung eines Aufbereitungsprotokolls, welches es im Gegensatz zur der beschriebenen Methode im IDF-Standard (IDF, 1991) ermöglicht, binnen weniger Minuten

ein Ergebnis zu erhalten, macht den Coulter Counter als Analysetool wieder attraktiv. Die Zentrifugation bei einer, im Vergleich zu den Literaturwerten, relativ hohen Zentrifugationsgeschwindigkeit von $1600 \times g$ und der Überkopfzentrifugation macht es möglich, einen nahezu fettfreien Überstand zu erhalten und diesen gemeinsam mit dem Zellpellet analysieren zu können. Damit werden deutlich mehr Zellen messbar gemacht, als bei einer niedrigeren Zentrifugationsgeschwindigkeit und der ausschließlichen Analyse des Zellpellets.

5.2 Bestimmung des SCC im Coulter Counter

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zum optimalen Bereich für die Bestimmung der somatischen Zellzahl im Coulter Counter. Einige Autoren nutzen für Partikelzahlbestimmung die Zählung bei einer Partikelgröße von $4,7 \mu\text{m}$ (Pearson et al., 1974) oder die Zählung in Bereichen von $5 \mu\text{m}$ bis $11 \mu\text{m}$ (Hill et al., 1982) bzw. $54 \mu\text{m}^3$ bis $150 \mu\text{m}^3$ ($4,69 \mu\text{m}$ - $6,59 \mu\text{m}$) (Hoare et al., 1982). Andere Autoren zählen die Partikel bis zum Zählmaximum der Kapillare, die Grenzwerte für den Zählbeginn reichen von $4,35 \mu\text{m}$ ($43 \mu\text{m}^3$) (Sheldrake et al., 1981), $4,7 \mu\text{m}$ (Pearson et al., 1974; Pearson et al., 1970), $5,5 \mu\text{m}$ (eigene Untersuchung), $7 \mu\text{m}$ (Fröhling et al., 2010), $7,24 \mu\text{m}$ (Read Jr et al., 1967) bis $7,5 \mu\text{m}$ (Phipps und Newbould, 1966). Aufgrund der Literaturangaben zu den Zellgrößen der somatischen Zellen in der Milch, welche, je nach Autor, mit einer minimalen Größe von $4 \mu\text{m}$ (Mielke, 1994), $5 \mu\text{m}$ (Liebich, 2010) oder $6 \mu\text{m}$ (Lerche et al., 1966) angegeben werden, erscheint die Wahl eines Grenzwertes von über $6 \mu\text{m}$ als unzulässig hoch. Im Mittel sind die unteren Grenzwerte zur SCC Bestimmung höher gewählt, wenn die Probenaufbereitung nicht chemisch, sondern mechanisch mittels Zentrifuge erfolgt. Eine mögliche Erklärung hierfür sind Reste von Fettpartikeln in der Probe, die bei niedrigeren Grenzwerten zu einer Überschätzung des SCC führen. So konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine nicht adäquate Zentrifugationsmethode zu Fettrückständen in der Probe und somit zu einem Überschätzen des SCC führt. Dieser Effekt tritt allerdings nur ein, wenn auch der Überstand in die Analyse einbezogen wird. So liegt es nahe, dass bei der Auswahl von sehr hohen unteren Grenzwerten, welche deutlich über der minimalen Zellgröße liegen, die Ursache eine für die umfassende Coulter Counter Analyse ungeeignete Probenaufbereitung ist. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass es möglich ist, die Probe so aufzubereiten, dass die Fettrückstände in der Probe gering genug für die Coulter Counter Messung sind.

Aufgrund dieser Tatsache kann die Wahl eines solchen Grenzwertes, der Zellen im Größenbereich der somatischen Zellen ausschließt, nicht als akzeptabel angesehen werden.

Vergleicht man die gewählten Partikelgrößen zur Bestimmung des SCC im Coulter Counter mit den Größenspannen für die Zelltypen, welche in Milch vorhanden sein können, so fällt auf, dass einige Untersuchungen nicht das ganze Spektrum der Zellen abdecken können. So sind in der Literatur kleine somatische Zellen ab einem Größenbereich von 4 μm (Mielke, 1994) und 5 μm (Liebich, 2010) angegeben. Damit lassen die Untersuchungen, die erst Partikel ab 6 μm oder 7 μm registrieren, diese Zellen außer Acht. Aufgrund der Tatsache, dass der Coulter Counter Partikel zählt und nicht explizit Zellen, werden mitunter nicht-Zell-Partikel mitgezählt. Diese werden mit dem Mikroskop oder der fluoreszenzoptischen Zellzählung nicht erfasst, da hier eine Unterscheidung stattfindet. Aufgrund dessen ist es möglich, dass im Coulter Counter geringfügig mehr Partikel gezählt werden, als Zellen vorhanden sind. Durch einen etwas höheren unteren Grenzwert kann dieser Effekt im gewissen Maße ausgeglichen werden.

In den eigenen Untersuchungen konnte mit einer Zählung der Partikel im Bereich von 5,5 μm bis 30 μm ein verwertbares Ergebnis zur Bestimmung des SCC mittels Coulter Counter erzielt werden. Die Ergebnisse sind dabei vergleichbar mit den Ergebnissen der Zellzählung mittels Coulter Counter nach der Aufbereitung nach IDF-Standard (IDF, 1991). Da diese Methode einstmalig international anerkannt war, sollte auch die Messung mit der in dieser Arbeit entwickelten Probenaufbereitung die Anforderung an eine Methode zur Zellzahlbestimmung in Milch erfüllen. Im Vergleich zur Bestimmung des SCC mittels einer Methode, die auf der Zählung der Zellkerne beruht, unterliegen die Ergebnisse des Coulter Counters größeren Schwankungen und eine Unterschätzung im Bereich hoher Zellzahlen. Für die ausschließliche Bestimmung des SCC bleibt die fluoreszenzoptische Zellzählung die schnellere und zuverlässigere Methode. Hier entfällt jedoch die Zusatzinformation der Partikelgrößenverteilung und die Anfärbung der Zellen ist von Nöten. Die Partikelzählung mittels Coulter Counter kann Zusatzinformationen zur bloßen Zellzählung liefern. Zudem liefert die entwickelte Aufbereitungsmethode, die eine Probenmessung binnen weniger Minuten ermöglicht, eine Genauigkeit, die mit der ehemaligen Methode nach IDF vergleichbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass die entwickelte Methode zur Messung praktikabel ist und sich die gewonnenen Ergebnisse zur Bestimmung des SCC und der weiteren Analyse der Partikel eignen.

5.3 Partikelgrößenverteilung und Einflüsse auf die Partikelgrößenverteilung

5.3.1 Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Milchfraktionen

Die Untersuchungen ergaben, dass weder der SCC noch die Partikelgrößenverteilung von Anfangsgemelk und Gesamtgemelk vergleichbar sind. Im Gegensatz zu Vangroenweghe et al. (2002), die keine Unterschiede zwischen den Milchfraktionen feststellten, waren die Fraktionen bei den eigenen Untersuchungen nicht vergleichbar. Die Definition der Gemelksfraktionen ist in den Veröffentlichungen nicht einheitlich. Aufgrund der Tatsache, dass nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, dass bei der Probennahme zu Beginn des Melkens bereits Alveolarmilch in den Proben enthalten ist, wurde diese in dieser Arbeit statt mit Vorgemelk mit Anfangsgemelk bezeichnet. Andere Autoren sprechen mitunter dennoch von Vorgemelk, weitere haben sichergestellt, dass es sich nur um Alveolarmilch handelt. Es wurden im Folgenden die Begriffe verwendet, die der Autor in seiner Veröffentlichung nennt.

In der Partikelgrößenverteilung unterscheiden sich Anfangsgemelk und Gesamtgemelk. Die Unterschiede zwischen den Milchfraktionen sind bei den untersuchten Einzeltieren jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt. Es liegen keine vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur vor, bei denen die Partikelgrößenverteilung in den Milchfraktionen untersucht wurde. Zahlreiche Untersuchungen zu den Unterschieden im SCC, sowie einige Studien, welche den DSCC von Anfangs- und Gesamtgemelk untersuchen, stützen jedoch die Beobachtung, dass auch in der Partikelgrößenverteilung die Milchfraktionen nicht vergleichbar sind. So untersuchten Olde Riekerink et al. (2007) den SCC Gehalt in der Milch im Verlauf und zwischen den Melkprozessen und wiesen niedrige Zellgehalte vor und zu Beginn des Melkens nach, sowie einen Anstieg des SCC zum Ende des Melkens hin mit einem maximalen Gehalt eine Stunde nach dem Melken. Dies erklärt auch die Befunde anderer Autoren, dass sich in dem Gesamtgemelk ein höherer Gehalt an Zellen findet als im Vorgemelk (Miller et al., 1993). Nielsen et al. (2005) unterscheiden im Verlauf des SCC während des Melkens zwischen gesunden und kranken Eutern. So zeigen sie für gesunde Euter einen konstanten SCC zu Beginn des Melkens und erst zum Ende einen Anstieg, während sie in der Milch von kranken Eutern einen stetigen SCC Anstieg über den Melkeprozess beobachten konnten. Sarikaya und Bruckmaier (2006) hingegen zählten im Vorgemelk einen höheren Anteil an somatischen Zellen als in den ersten 400 g der

Alveolarmilch. Mit ihren Untersuchungen, die zeigen, dass nach den ersten 400 g der Alveolarmilch der Zellgehalt wieder anstieg, bestätigten sie jedoch die Untersuchungen der anderen Autoren. Auch Untersuchungen von Wellnitz et al. (2009) zeigen, dass die Ergebnisse der Zellzählung zwischen den Fraktionen nicht übertragbar sind. Sie fanden je nach Zellzahlklasse einen höheren oder niedrigeren Gehalt an Zellen im Vorgemelk im Vergleich zum Hauptgemelk. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der SCC im Vorgemelk stark von dem in der Alveolarmilch abweichen kann (Sarıkaya und Bruckmaier, 2006) und somit eine Übertragung von Ergebnissen der SCC Bestimmung in einer Milchfraktion nicht auf die Ergebnisse einer anderen Milchfraktion möglich ist. Aufgrund der Tatsache, dass signifikante Korrelationen zwischen SCC und DSCC und demnach auch zu der Partikelgrößenverteilung bestehen, die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit bestätigen diese Studien, dass es nicht möglich ist, die Ergebnisse und Validierungen von einer Milchfraktion auf andere Fraktionen zu übertragen. Gerade zum Gesundheitsmonitoring ist eine Übertragung von Ergebnissen zwischen verschiedenen Milchfraktionen nicht vertretbar, da die Entwicklung des SCC über den Melkprozess von dem Gesundheitsstatus beeinflusst wird (Nielsen et al., 2005; Wellnitz et al., 2009).

Noch besser auf Ergebnisse der Partikelverteilung übertragbar als die Untersuchungen zum SCC sind verschiedene Untersuchungen zum DSCC. Dieser berücksichtigt den Anteil der unterschiedlichen Zelltypen, die in der Zellgröße variieren. Verschiedene Autoren wiesen nach, dass sich der DSCC in den unterschiedlichen Milchfraktionen verändert (Ostensson et al., 1988; Sarıkaya und Bruckmaier, 2006; Winter et al., 2009). Im Laufe des Melkprozesses kommt es zu einem Anstieg des Anteils an PMNs sowie zu einem Abfall an Makrophagen (Sarıkaya und Bruckmaier, 2006; Winter et al., 2009). Ostensson et al. (1988) wiesen zudem nach, dass der Anteil der Lymphozyten im Melkprozess ansteigt, jedoch im Nachgemelk geringer ist als im Hauptgemelk. Für Tiere mit geringen Zellzahlen konnten sie jedoch nur bei dem Anteil der Makrophagen einen Anstieg über den Melkprozess beobachten. Da die verschiedenen Zelltypen sowohl einen unterschiedlichen Größenbereich, als auch eine abweichende Oberflächenstruktur haben, liegt nahe, dass eine Veränderung der Zellverteilung auch eine Änderung der Partikelgrößenverteilung bewirkt. Somit ist eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung zwischen den Milchfraktionen erklärt.

Aus diesen Erkenntnissen, gestützt durch die Untersuchungen weiterer Autoren, lässt sich sagen, dass die Untersuchungen und Ergebnisse ausschließlich auf das Gesamtgemelk von

Kühen anzuwenden sind. Diese Ergebnisse lassen sich nicht auf andere Milchfraktionen übertragen. Um Ergebnisse verschiedener Autoren vergleichen zu können, ist die Kenntnis der untersuchten Milchfraktion von großer Bedeutung.

Die Betrachtung des Gesamtmelks einer an Mastitis erkrankten Kuh zeigte, dass eine viertelindividuelle Betrachtung der Milch noch sensitiver bezüglich der Partikelgrößenverteilung sein wird. Die Verteilung der Partikelgrößen bei dem Gesamtmelk des erkrankten Viertels und bei einem Gemisch aller vier Viertel ist vergleichbar. Dadurch jedoch, dass bei einer viertelindividuellen Betrachtung der Verdünnungseffekt durch die Milch der gesunden Viertel wegfallen würde, ist die Veränderung der Partikelgrößenverteilung durch die Mastitis deutlicher ausgeprägt.

5.3.2 Partikelgrößenverteilung im Coulter Counter

Die Partikelgrößen der Zellen der Milch gesunder Tiere befinden sich laut ausgewerteter Literatur im Bereich von 4 μm bis 30 μm , wobei die Anzahl der Zellen zu den größeren Partikelgrößen hin deutlich abfällt und bei Größen über 10 μm nur noch vereinzelt Partikel zu finden sind. Dies passt zu der allgemeinen Größenverteilung von somatischen Zellen, welche mit 4 μm bis 8 μm (Mielke, 1994), 5 μm bis 10 μm (Liebich, 2010) und 6 μm bis 9 μm (Lerche et al., 1966) für Lymphozyten, 4 μm bis 9 μm (Mielke, 1994), 9 μm bis 12 μm (Lerche et al., 1966), 10 μm bis 12 μm (Liebich, 2010), 9 μm bis 13 μm (Kraft und Dürr, 2005) für PMNs und 8 μm bis 30 μm (Mielke, 1994) Makrophagen angegeben wird.

Die durchgeführten Analysen von Mehrfachbestimmungen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Partikelgrößenverteilung und der Gesamtpartikelzahl. Allerdings kommt es gelegentlich zu Ausreißern, welche mit der Probenaufbereitung erklärt werden können. Die Ausreißer übersteigen in der Partikelzahl die B Probe sowie den Vergleichswert aus der FossomaticTM 5000 um ein Vielfaches. Unerklärbar hohe Partikelzahlen im Vergleich zu den mittels Fossomatic bestimmten Referenzwerten wurden auch während der Entwicklung der Aufbereitungsmethode gefunden. Dies war der Fall, wenn die Probe, durch eine zu geringe Zentrifugationsgeschwindigkeit oder die Resuspension von Fettpartikeln im Überstand beim Abspateln des Fetts, bei der Messung im Coulter Counter noch Fettanteile enthielt. Aufgrund dieser Erkenntnisse ließ sich erschließen, dass dies auf Fett in der Probe zurückzuführen ist. Erklärt werden können diese Ausreißer durch Schwierigkeiten in der

Probenaufbereitung da es in Einzelfällen, beispielsweise bei einer sehr dünnen Fettschicht durch sehr geringe Fettgehalte in der Milch zu Problemen in der Abtrennung führt. Da es sich aber hier nachweislich um Einzelfälle handelt, könnte man durch eine Dreifachbestimmung und die Nutzung des Medians dieses Problem eliminieren.

In der Milch von gesunden Tieren überwiegt nach Angaben der meisten Autoren der Anteil von Lymphozyten (Pilla et al., 2012; Schwarz et al., 2011a; Sladek et al., 2005). Diese sind die kleinsten der somatischen Zellen in der Milch und befinden sich in einem Größenbereich von 4 µm / 5 µm (Liebich, 2010; Mielke, 1994) bis maximal 10 µm (Liebich, 2010). Dies passt zu dem vergleichsweise hohen Partikelanteil im vorderen Bereich der Partikelgrößen. Auch der Anteil an Makrophagen wird in der Milch von gesunden Eutern als relativ hoch angegeben (Sarıkaya, 2006). Zu beachten ist bei dem Vergleich der Ergebnisse der Zelldifferenzierung mit den Daten des Coulter Counters die Tatsache, dass es sich bei den Angaben des DSCC um Anteile handelt, bei dem Coulter Counter um Absolutwerte. So ist die Gesamtzahl der Zellen in der Milch eines gesunden Euters im Vergleich zu der Milch einer an Mastitis erkrankten Kuh sehr gering. Somit kann die Gesamtzahl der Lymphozyten in der Milch eines gesunden Euters die Gesamtzahl an Lymphozyten in der Milch eines kranken Euters übersteigen, obwohl der Anteil an Lymphozyten im gesunden Euter am höchsten ist. Die verschiedenen Zelltypen bzw. die Partikelgrößen im Coulter Counter müssen also im Verhältnis zueinander betrachtet werden. Deshalb wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei der Klassifikation des Gesundheitsstatus Verhältnisse von Partikelgrößen für die Klassifikation der Milch genutzt. Generell ist bei der Partikelverteilung der Milch eines gesunden Euter kein Peak zu sehen und die Anzahl der Partikel nimmt zu den größeren Partikeln hin ab. Dies passt zu den vorgenannten Untersuchungen, dass in einem gesunden Euter der Anteil der kleinen Lymphozyten überwiegt.

Im Falle einer Mastitis verändert sich die Partikelgrößenverteilung deutlich. Im Bereich von etwa 6,5 µm bis 11 µm steigt die Partikelzahl stark an. In der Partikelgrößenverteilung zeigt sich in diesem Bereich ein deutlicher Peak. Das Verhältnis zwischen der Anzahl der Partikel in kleinen Partikelgrößenbereichen zu der Anzahl in dem Bereich von 7,5 µm bis 9,5 µm verschiebt sich zugunsten der größeren Partikel. Vergleicht man diese Entwicklung mit den Untersuchungen zur Zelldifferenzierung, so sieht man hier eine Übereinstimmung. Die meisten Autoren zeigen einen Anstieg des Anteils an PMNs im Falle einer Mastitis (Koess und Hamann, 2008; Leitner et al., 2000b; Merle et al., 2007; Pilla et al., 2012; Swain et al.,

2015). Die Größe der PMNs, wie sie in der Literatur angegeben wird, deckt sich mit dem Bereich, in dem es während einer Mastitis zu einem deutlichen Partikelanzahlanstieg kommt. Des Weiteren zeigen viele Autoren mit dem Anstieg des Anteils an PMNs während einer Erkrankung einen gleichzeitigen Abfall des relativen Anteils an Lymphozyten (Koess und Hamann, 2008; Merle et al., 2007; Pilla et al., 2012; Rivas et al., 2001b). Die Lymphozyten werden in der Literatur als kleiner als die PMNs angegeben. Die Verschiebung der verhältnismäßigen Anzahl an Partikeln im Bereich kleiner Partikel (vorderer kritischer Bereich) zu der etwas größerer Partikel (mittlerer kritischer Bereich) im Coulter Counter passt zu dieser Beobachtung. Beim Vergleich bestimmter Partikelgrößenbereiche im Coulter Counter konnte kein direkter Zusammenhang zur Häufigkeit von PMNs nachgewiesen werden, da dies nicht Gegenstand der Untersuchung war. In der Literatur jedoch konnte ein Zusammenhang ($r=0,39$, $P<0,05$) zwischen den Verhältnissen der Anzahl der Partikel im Bereich von $5,5\ \mu\text{m}$ bis $7,0\ \mu\text{m}$ und von $4,4\ \mu\text{m}$ bis $5,5\ \mu\text{m}$ nachgewiesen werden (Hoare et al., 1980).

Während allein durch die Bestimmung der somatischen Zellzahl keine Unterscheidung zwischen klinisch und subklinisch erkrankten Tieren vorgenommen werden kann, sind bei der Analyse der Partikelgrößenverteilung Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen zu sehen. Tabelle 21 zeigt die klassische Unterteilung von Mastitiden, welche aufgrund zytologischer und mikrobiologischer Befunde erfolgt (DVG, 2012).

Tabelle 21: Beurteilung zytologischer und mikrobiologischer Milch-Befunde nach DVG (2012)

somatische Zellen/ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	<i>nicht nachgewiesen</i>	<i>nachgewiesen</i>
< 100.000	normale Sekretion	latente Infektion
> 100.000	unspezifische Mastitis	Mastitis

Es konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass anhand der Zelldifferenzierung Unterschiede zwischen den Zellanteilen in der Milch klinisch und subklinisch erkrankter Tiere gefunden werden können. So steigt der Anteil an PMNs in der Milch mit zunehmender Schwere der Infektion an und ist in der Milch subklinisch erkrankter Tiere signifikant geringer als in der Milch klinisch erkrankter Tiere (Pilla et al., 2012; Swain et al., 2015). Der

Anteil an Lymphozyten nahm mit der Schwere der Infektion ab, während der Anteil an Makrophagen weitestgehend konstant blieb (Pilla et al., 2012). Leitner et al. (2000b) untersuchten den DSCC in der Milch von Tieren mit Mastitis, welche von unterschiedlichen Erregern befallen waren. Auch sie wiesen bei akut erkrankten Tieren (*E. coli*, *S. aureus*) höhere Anteile an Neutrophilen auf als in der Milch von chronisch infizierten Tieren (*S. aureus*, *CNS*, *S. dysgalactiae*). Auch die Anteile an Epithelzellen waren je nach Krankheitsform unterschiedlich. So war der Anteil dieser in der Milch klinisch erkrankter Kühe niedriger als bei der subklinischen Form.

Auch bei den vorliegenden Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung konnten Unterschiede zwischen den Proben klinisch und subklinisch erkrankter Tiere festgestellt werden. So ist bei der Partikelgrößenverteilung in der Milch klinisch erkrankter Tiere ein Peak mit einem Maximum bei etwa 7,5 µm bis 9,5 µm zu sehen, während bei den Partikelgrößenverteilungen in der Milch subklinisch erkrankter Tiere nicht dieser stark ausgeprägte Peak zu finden ist, sondern eine entweder generell flachere Form im Bereich von 5 µm bis 13 µm oder eine Art Doppelpeak mit den Maxima jeweils vor und hinter dem Maximum der Peaks in der Milch klinisch erkrankter Kühe. Legt man diesen Beobachtungen die Zellgrößenangaben der Literatur zu Grunde, könnte es sich hier um Lymphozyten oder PMNs handeln, wobei die Lymphozyten auch schon in niedrigeren Partikelgrößenbereichen auftauchen müssten (vergl. Kapitel 2.2.1 und 2.1.2). Mit Hilfe der Angaben aus der Zelldifferenzierung und den eigenen Beobachtungen der Zellgrößenverteilung lässt sich ableiten, dass es sich bei dem Peak in der Milch klinisch erkrankter Tiere vor allem um PMNs handelt, deren Anteil in der Milch subklinisch erkrankter Tiere im Vergleich hierzu geringer ist und damit auch im Bild der Partikelgrößenverteilung weniger ausgeprägt zu finden ist.

5.3.3 Unterscheidung von gesunden, subklinisch erkrankten und erkrankten Tieren

Es wurde untersucht, ob es möglich ist, anhand der Zellgrößenverteilung den Eutergesundheitsstatus eines Tieres zu ermitteln. In der Literatur ist keine Untersuchung zu finden, die die Partikelgrößenverteilung mittels Coulter Counter nutzt, um ein Alarmsystem für den Eutergesundheitsstatus zu entwickeln. Die Literatur beschäftigt sich größtenteils ausschließlich mit der Zellzählung mittels Coulter Counter (Hoare et al., 1982; Miller et al., 1986; Pearson et al., 1974; Read Jr et al., 1967; Sheldrake et al., 1981). Dass eine Bestimmung der Zellzahl auch mit der neu entwickelten Aufbereitungsmethode möglich ist,

konnte belegt werden. Weitergehende Studien, die auch die Partikelgrößenverteilung zum Informationsgewinn nutzen, konnten nur in einem Fall gefunden werden (Hoare et al., 1980). Sie untersuchen in ihrer Studie den Zusammenhang von Zellvolumen und Mastitis und konzentrieren sich hierbei auf drei Bereiche; Bereich 6 mit 4,4 μm bis 5,5 μm , Bereich 7 mit 5,5 μm bis 7,0 μm und Bereich 8 mit 7,0 μm bis 8,8 μm . Damit sind die von ihnen gewählten Bereiche im Vergleich zu den eigenen gewählten Bereichen etwas nach vorne verschoben (vorderer kritischer Bereich: 5,5 μm bis 6,5 μm ; mittlerer kritischer Bereich: 7,5 μm bis 9,5 μm). Der Bereich 6 wurde in den eigenen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Trotz der leichten Größenverschiebung kommen sowohl Hoare et al. (1980), als auch die eigenen Untersuchungen zu einem ähnlichen Größenbereich, der für das Gesundheitsmonitoring relevant ist.

Für den Trainingsdatensatz konnten mit der entwickelten Methode gute Ergebnisse für die Erkennung des Eutergesundheitsstatus anhand der Partikelgrößenverteilung erzielt werden. Gesunde Tiere wurden zu 86,5 % erkannt, subklinisch erkrankte zu 95,7 % und klinisch erkrankte zu 73,1 %. Die Fehlerraten betrugen hierbei 2,1 %, 28,7 % und 3,2 %. Die Fehlerrate für die subklinisch erkrankten Tiere ist mit 28,7 % relativ hoch. Beachtet man jedoch den Umstand, dass es sonst mit kaum einem System möglich ist, subklinisch erkrankte Tiere als extra Klasse zu betrachten, relativiert sich der Eindruck eines schlechten Ergebnisses. Bei der organoleptischen Betrachtung von Milch, ist die Milch subklinisch erkrankter Tiere nicht von der Milch gesunder Tiere zu unterscheiden. Bei der reinen Zellzahlmessung hingegen, fallen die subklinisch erkrankten Tiere in eine Gruppe mit den klinisch erkrankten Tieren. Somit stellt diese Unterscheidungsmöglichkeit, die das entwickelte System auf Basis der Coulter Counter Daten bietet, eine Verbesserung zu bisherigen Möglichkeiten dar.

Die Genauigkeit der Klassifikation könnte durch eine genaue mathematische Klassifikation noch verbessert werden. Durch die Diskriminanzanalyse könnte die Klassifikation optimiert werden. Es handelt sich hierbei um ein multivariates Verfahren zur Analyse von Gruppenunterschieden. Zur Anwendung der Diskriminanzanalyse ist ein, hier auch vorhandener, Trainingsdatensatz mit bekannter Gruppenzugehörigkeit Voraussetzung. Anhand der Parameter zur Zuordnung kann dann ein neues Element mit unbekanntem Status, hier einem unbekannten Eutergesundheitsstatus, eingeordnet werden (Backhaus et al., 2000). Auch die Fuzzy-Pattern-Klassifikation ist eine Möglichkeit. Das Verfahren findet auch in der

Medizindiagnostik Anwendung. Es ist hierbei möglich, eine Klassifizierung anhand mehrdimensionaler Merkmalsvektoren durchzuführen (Bocklisch, 1987).

5.3.4 Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Mastitis

Es wurde anhand verschiedener Tiere die Partikelgrößenverteilung im Verlauf einer Mastitis untersucht. Fröhling et al. (2010) betrachteten in ihre Untersuchungen ebenfalls einen längeren Zeitraum im Krankheitsverlauf, allerdings nutzten sie für ihre Analysen das Anfangsgemelk. Hier zeigten die eigenen Untersuchungen, dass diese Ergebnisse untereinander nicht direkt vergleichbar sind (vergl. Kapitel 4.3.1). Dennoch zeigen auch diese Untersuchungen den deutlichen Peak im Falle einer Mastitis. Die von Fröhling et al. (2010) beschriebene Verschiebung des Peaks von einem Maximum bei etwa 8 μm zu einem Maximum bei etwa 12 μm im Laufe der Mastitis konnte in den eigenen Untersuchungen nur in Einzelfällen, nicht jedoch generell bestätigt werden. Dass eine Veränderung der Zellgrößenverteilung im Laufe der Erkrankung zu beobachten ist, bestätigen jedoch sowohl diese Untersuchungen, als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. In den eigenen Untersuchungen ist zu beobachten, dass die Kennzahlen der Partikelgrößenverteilung im Krankheitsverlauf sich von denen bei einer Mastitis in Richtung derer einer subklinischen Mastitis verändern. Dies ist auch insofern nachvollziehbar, als mit fortschreitender Behandlung der akute Entzündungsprozess zurück geht und auch die organoleptischen Befunde unauffällig werden.

Einige Autoren untersuchten den DSCC im Verlauf einer Mastitis. Hier fanden Enriquez-Valencia et al. (2015), dass nach einer ausgelösten Mastitis durch die Infusion von *Weissella confusa* direkt nach der Infusion der Anteil an PMNs stark ansteigt, während der Anteil an Makrophagen und Lymphozyten sinkt. Die Anteile an PMNs und Lymphozyten blieben bis etwa eine Woche nach der Infusion relativ konstant und bewegten sich danach langsam wieder in die Richtung ihres Niveaus in gesunder Milch, wobei sich der Anteil an Lymphozyten schneller normalisierte als der der PMNs. Der Anteil der Makrophagen stieg direkt am zweiten Tag nach der Infusion wieder an, die weitere Normalisierung lief darauf folgend jedoch sehr langsam ab. Rivas et al. (2001a) untersuchten die Veränderung des DSCC nach der Infusion mit *S. aureus* über 14 Tage. Auch sie konnten nach der Infusion einen Abfall des Anteils der Lymphozyten und einen Anstieg des Anteils der PMNs feststellen. Bei den Makrophagen ergaben ihre Untersuchungen große tierindividuelle Unterschiede und es

waren sowohl relativ konstant bleibende Anteile dieser, als auch ein Abfall oder ein Anstieg der Anteile nach der Infusion zu verzeichnen. Die Anteile an Lymphozyten und PMNs normalisierte sich im Verlauf, jedoch waren die Werte auch nach 14 Tagen noch nicht auf dem Ausgangsniveau, welches vor der *S. aureus* Infusion vorlag. Diese Untersuchungen sind auf die eigenen Beobachtungen der Partikelgrößenverteilung im Krankheitsverlauf gut übertragbar. Auch die eigenen Untersuchungen zeigten zu Beginn der Mastitis einen starken Peak in der Partikelgrößenverteilung, welcher sich im Krankheitsverlauf in der Höhe abschwächte und über ein breites Spektrum an Partikelgrößen reichte. Auch in den eigenen Untersuchungen dauerte eine Normalisierung der Partikelgrößenverteilung zum Teil bis über den Untersuchungszeitraum an.

In einigen Fällen kam es während der Beobachtung zu einem erneuten Ausbruch. Hier konnte mitunter bereits in der Melkung vor dem Anstieg des SCC eine Änderung in der Partikelgrößenverteilung festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits im Jahr 1955 gemacht. Hier wurde ein Grenzwert von einem PMN Anteil von unter 45 % als besserer Indikator für Eutergesundheit identifiziert als der SCC (Blackburn et al., 1955). Bis heute wurde diese Überlegenheit einer solchen Information jedoch nicht konsequent im Gesundheitsmonitoring genutzt.

6 Schlussfolgerungen

Die Analyse der Partikelgrößenverteilung in der Milch ist eine Möglichkeit das Gesundheitsmonitoring zu verbessern. Sie zeigt eine Überlegenheit gegenüber der Bestimmung des SCC mittels fluoreszenzoptischem Verfahren.

Durch die entwickelte Probenaufbereitungsmethode wurde die Möglichkeit geschaffen, Milchproben zeitnah zu analysieren. Dies macht den Einsatz des Coulter Counters zum Gesundheitsmonitoring wieder interessant. Das Messprinzip des Coulter Counters bietet gegenüber dem derzeitigen Standardverfahren (fluoreszenzoptisches Verfahren) den Vorteil, neben der Bestimmung der Gesamtzellzahl auch die Partikelgrößenverteilung darstellen zu können.

Eine noch detailliertere Information über die Art der somatischen Zellen in der Milch bietet lediglich die Zelldifferenzierung, welche jedoch in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Die Zelldifferenzierung ist nur in zeit- und materialintensiven Laboranalysen möglich. Dadurch ist diese Methode für die produktionsnahe Analyse von Milchproben nicht nutzbar.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Analyse der Partikelgrößenverteilung in ihrem Informationsgehalt der alleinigen Bestimmung des SCC überlegen ist. Für die Feststellung des Gesundheitsstatus mittels der Partikelgrößenverteilung, ist es nötig, diese Daten detaillierter zu analysieren. Hierfür wurden Quotienten aus den ermittelten relevanten Partikelgrößenbereiche (5,5 μm bis 6,5 μm , 7,5 μm bis 9,5 μm , 10 μm bis 12 μm) und jeweils der Gesamtpartikelzahl gebildet. Durch die daran anschließende Nutzung von Algorithmen war es möglich, anhand der gemessenen Zellzahl und Partikelgrößenverteilung in Milchproben den Gesundheitsstatus der Kuh zu bestimmen.

Um die Methode zur Erkennung des Gesundheitsstatus zu verifizieren und zu überprüfen, ob das System als Frühwarnsystem geeignet ist, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Hierfür würden sich Untersuchungen in verschiedenen Betrieben anbieten, um zu prüfen, ob die Algorithmen auf andere Herden übertragbar sind.

Die Untersuchungen zeigten, dass es möglich ist, diese Klassifikation aus dem Gesamtgemelk aller vier Viertel und trotz tierindividueller Unterschiede, erfolgreich vorzunehmen.

Gleichzeitig war ein deutlicher Verdünnungseffekt der Milch der gesunden Viertel mit der eines kranken Viertels festzustellen. Somit ist davon auszugehen, dass die Krankheitserkennung auf viertelindividueller Ebene in ihrer Güte noch deutlicher wäre. Möglicherweise könnte auch ein Vergleich zwischen der Milch der Viertel und damit die Eliminierung der tierindividuellen Effekte noch optimieren.

Eindeutiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass sich die Milchanalyse mittels Coulter Counter und die darauffolgende Datenanalyse eignet um Milch nach Eutergesundheitsstatus zu klassifizieren. Für die praktische Nutzung dieser Erkenntnisse wäre die Vorhersagekraft des entwickelten Systems zu überprüfen. Bei Erfolg hat das System großes Potenzial ein prozessbegleitendes online-Tool für die Mastitisfrüherkennung zu werden.

Der bisherige Nachteil der Methode, welcher in einer aufwändigen und langwierigen Probenaufbereitung lag, konnte mit der neu entwickelten Methode minimiert werden. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten praktischen Nutzbarkeit und Informationskraft der Analyseergebnisse dieser Methode in Kombination mit den vorgestellten Auswertungsalgorithmen sollte eine Wiederaufnahme der modifizierten Methode in den IDF-Standard in Erwägung gezogen werden und die Methode so zu einem weltweit anwendbaren Standard gemacht werden.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum Ersten eine praktikable Aufbereitungsmethode für die Messung von somatischen Zellen im Coulter Counter zu entwickeln. Diese bildet die Voraussetzung um zum Zweiten die Nutzbarkeit des Coulter Counters als Analysetool für die Beurteilung der Eutergesundheit zu prüfen. Hierzu wurde die Eignung der Zellgrößenverteilung zur Unterscheidung von Milch gesunder, subklinisch erkrankter und erkrankter Tiere getestet.

Es konnte eine Probenaufbereitungsmethode entwickelt werden, welche es ermöglicht, die Proben binnen weniger Minuten so aufzubereiten, dass es möglich ist, einen Großteil der somatischen Zellen sowie ihre Größenverteilung im Coulter Counter messbar zu machen. Dies ist möglich durch eine Fettabtrennung mittels Überkopfzentrifugation mit hoher Geschwindigkeit ($1600 \times g$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 Minuten).

Nach der Überkopfzentrifugation ist es möglich das Fett, ohne die Resuspension von Fettpartikeln, vom Überstand zu trennen und somit auch die Zellen im Überstand im Coulter Counter messbar zu machen. Durch die Nutzung von Zellpellet und Überstand gehen kaum Zellen für die Analyse verloren.

Die Partikelgrößenverteilung verändert sich im Falle einer Mastitis deutlich. Auf Basis der Partikelgrößenverteilungsdaten konnten Algorithmen zur Differenzierung des Gesundheitsstatus entwickelt werden. Die Zuordnung des Gesundheitsstatus konnte im Testdatensatz mit einer Spezifität von 100 % für den Status gesund, 96,9 % für den Status subklinisch erkrankt und 91,2 % für den Status erkrankt nachgewiesen werden. Zudem konnte in einigen Fällen bereits vor Anstieg des SCC eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung detektiert werden.

7. Summary

The aim of this study was, in the first place, to develop a practicable preparation method for measuring somatic cells with the Coulter Counter. This was necessary to create the conditions to use the Coulter Counter as analysis tool for udder health status. The verification of the suitability of using the cell size distribution, which can be detected in the Coulter Counter, to distinguish healthy, subclinical infected and infected cows was the second step of this study.

A method which allows analyzing the milk samples within some minutes could be developed. Additionally this method guarantees that most of the cells will be included in the sample. This is possible by fat separation via overhead centrifugation with high speed ($1600 \times g$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 min).

Using the overhead centrifugation gives the possibility to separate the fat and supernatant fractions without any resuspension of fat particles in the supernatant. This enables to make the cells in the supernatant measurable in the Coulter Counter. By using cell pellet and supernatant the loss of cells which can be analyzed is minimal as possible.

In case of mastitis the cell size distribution varies significantly. Therefore it was possible to detect the udder health status by using special algorithms. The classification of the udder health status could be done with a specificity of 100 % for the status healthy, 96,6 % for the status subclinical infected and 91,2 % for the status clinical infected. Additionally, it could be detected a change of the cell size distribution of some cows even before the SCC rose.

Summarizing the above, it could be said that by using the developed sample preparation method the Coulter Counter is a tool for prompt analysis. By analyzing the particle size distribution and the utilization of algorithms milk could be clustered reliably to a health status. This demonstrated the systems potential for an online health detection system.

8. Literaturverzeichnis

- Aitken, S.L., Corl, C.M., Sordillo, L.M., 2011. Immunopathology of Mastitis: Insights into Disease Recognition and Resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, 291-304.
- Akers, R., Nickerson, S., 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, 275-289.
- Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, S.P., Mohanty, A.K., Dang, A.K., 2015. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. *Veterinary World* 8, 685-689.
- Auldish, M.J., Hubble, I.B., 1998. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technologie* 53, 28-36.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R., 2000. *Multivariate Analysemethoden*, Vol 9. Springer Verlag, Heidelberg.
- Baumert, A., Bruckmaier, R.M., Wellnitz, O., 2009. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 76, 356-364.
- Berglund, I., Pettersson, G., Östensson, K., Svennersten-Sjaunja, K., 2007. Quarter milking for improved detection of increased SCC. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 427-432.
- Blackburn, P.S., 1966. The variation in the cell count of cow's milk throughout lactation and from one lactation to the next. *Journal of Dairy Research* 33, 193-198.
- Blackburn, P.S., Laing, C.M., Malcolm, D.F., 1955. 569. A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 22, 37-42.
- Blagitz, M., Souza, F., Batista, C., Diniz, S., Azevedo, L., Silva, M., Haddad, J., Heinemann, M., Cerqueira, M., Della Libera, A., 2015a. Flow cytometric analysis: Interdependence of healthy and infected udder quarters. *Journal of dairy science* 98, 2401-2408.
- Blagitz, M.G., Souza, F.N., Batista, C.F., Santos, B.P., Parra, A.C., Azevedo, L.F.F., Della Libera, A., 2015b. Expression of CD14 and toll-like receptors 2 and 4 by milk neutrophils in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. *Pesqui. Vet. Bras.* 35, 1-5.
- Bocklisch, S.F., 1987. *Prozessanalyse mit unscharfen Verfahren*. Verlag Technik, Berlin.
- Boutinaud, M., Jammes, H., 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reproduction Nutrition Development* 42, 133-147.
- Brown, C.A., Rischette, S.J., Schultz, L.H., 1986. Relationship of Milking Rate to Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science* 69, 850-854.
- Clough, N.C., Roth, J.A., 1998. *Understanding Immunology*. Mosby.
- Detilleux, J., Kastelic, J., Barkema, H., 2015. Mediation analysis to estimate direct and indirect milk losses due to clinical mastitis in dairy cattle. *Preventive veterinary medicine* 118, 449-456.
- Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leen, A.M., Burvenich, C., 2003. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *Journal of Dairy Science* 86, 828-834.
- Dulin, A.M., Paape, M.J., Weinland, B.T., 1982. Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic-cells. *Journal of Dairy Science* 65, 1247-1251.

- DVG, 2002. Sachverständigenausschuss: „Subklinische Mastitis“: Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem, Vol 4.Auflage. Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Gießen, Hannover, - pp.
- DVG, 2012. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. , Vol 5. Auflage. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft DVG, Fachgruppe "Milchhygiene" Gießen.
- Enriquez-Valencia, C.E., Serna-Cock, L., Campos-Gaona, R., 2015. Intramammary infusion of *Weissella confusa* affects somatic cell counts and milk differential leukocyte count. *Cienc. Rural* 45, 835-841.
- Fröhling, A., Wienke, M., Rose-Meierhöfer, S., Schlüter, O., 2010. Improved method for mastitis detection and evaluation of disinfectant efficiency during milking process. *Food and Bioprocess Technology* 3, 892-900.
- Frost, A.J., Hill, A.W., Brooker, B.E., 1982. Pathogenesis of experimental bovine mastitis following a small inoculum of *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science* 33, 105-112.
- Green, L.E., Schukken, Y.H., Green, M.J., 2006. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count? *Preventive Veterinary Medicine* 76, 74-89.
- Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E., 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 92, 3124-3133.
- Hand, K.J., Godkin, A., Kelton, D.F., 2012. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *Journal of Dairy Science* 95, 1358-1362.
- Hill, A.W., Hibbitt, K.G., Davies, J., 1982. Particles in bulk milk capable of causing falsely high electronic cell counts. *Journal of Dairy Research* 49, 171-177.
- Hoare, R.J.T., Nicholls, P.J., Sheldrake, R.F., 1982. Investigations into falsely elevated somatic-cell counts of bulked herd milk. *Journal of Dairy Research* 49, 559-565.
- Hoare, R.J.T., Sheldrake, R.F., Nicholls, P.J., McGregor, G.D., Woodhouse, V.E., 1980. Analysis of somatic cell volume distribution as an aid to the diagnosis of mastitis. *Journal of Dairy Research* 47, 167-176.
- IDF 1991. Milk- Enumeration of somatic cells (Brussel, IDF).
- IDF 2006. Milk- Enumeration of somatic cells- Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters (ISO/ IDF).
- IDF 2008. Milk -- Enumeration of somatic cells -- Part 1: Microscopic method (Reference method) (IDF/ ISO).
- Kehrli Jr, M.E., Shuster, D.E., 1994. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 77, 619-627.
- Kelly, A.L., Reid, S., Joyce, P., Meaney, W.J., Foley, J., 1998. Effect of decreased milking frequency of cows in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte numbers, composition and proteolytic activity. *Journal of Dairy Research* 65, 365 - 373.
- Kelly, A.L., Tiernan, D., O'Sullivan, C., Joyce, P., 2000. Correlation Between Bovine Milk Somatic Cell Count and Polymorphonuclear Leukocyte Level for Samples of Bulk Milk and Milk from Individual Cows. *Journal of Dairy Science* 83, 300-304.
- Koç, A., Kizilkaya, K., 2009. Some factors influencing milk somatic cell count of Holstein Friesian and Brown Swiss cows under the Mediterranean climatic conditions. *Archiv Tierzucht Dummerstorf* 52, 124-133.
- Koess, C., Hamann, J., 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research* 75, 225-232.
- Kraft, W., Dürr, U.M., 2005. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Auflage Edition. Schattauer GmbH, Stuttgart

- Krömker, V., 2007. Kurzes Lehrbuch der Milchkunde und Milchhygiene. Parey, Stuttgart.
- Kurzhals, P., Klima, H., Manz, D., 1985. Beziehungen zwischen Zellzahl, Zellbild und bakteriologischen Befunden bei der subklinischen Mastitis des Rindes. *Milchwissenschaft* 40, 6-9.
- Lakic, B., Wredle, E., Svennersten-Sjaunja, K., Östensson, K., 2009. Is there a special mechanism behind the changes in somatic cell and polymorphonuclear leukocyte counts, and composition of milk after a single prolonged milking interval in cows? *Acta Veterinaria Scandinavica* 51, 1-10.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y., 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Science & Technology* 91, 247-282.
- Lee, C.-S., Wooding, F.B.P., Kemp, P., 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *Journal of Dairy Research* 47, 39-50.
- Leitner, G., Chaffer, M., Krifucks, O., Glickman, A., Ezra, E., Saran, A., 2000a. Milk Leucocyte Populations in Heifers Free of Udder Infection. *Journal of veterinary medicine. B, infectious diseases and veterinary public health* 47, 133 - 138.
- Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S., Saran, A., 2003. Immune Cell Differentiation in Mammary Gland Tissues and Milk of Cows Chronically Infected with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50, 42-52.
- Leitner, G., Merin, U., Krifucks, O., Blum, S., Rivas, A.L., Silanikove, N., 2012. Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: Comparison among cows, goats and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147, 202-210.
- Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M., Saran, A., 2000b. Milk Leucocyte Population Patterns in Bovine Udder Infection of Different Aetiology. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 47, 581-589.
- Lerche, M., Bartels, H., Beck, G., Kästli, P., Münchberg, F., Sinell, H., Terplan, G., Wegener, K., 1966. Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Liebich, H.-G., 2010. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 5. Auflage Edition. Schattauer GmbH, Stuttgart.
- Liu, Y., Chen, W., Ali, T., Alkasir, R., Yin, J., Liu, G., Han, B., 2014. Staphylococcal Enterotoxin H Induced Apoptosis of Bovine Mammary Epithelial Cells in Vitro. *Toxins* 6, 3552-3567.
- Lun, S., Aström, G., Magnusson, U., Östersson, K., 2007. Total and Differential Leucocyte Counts and Lymphocyte Subpopulations in Lymph, Afferent and Efferent to the Supramammary Lymph Node, During Endotoxin-Induced Bovine Mastitis. *Reproduction in domestic animals* 42, 126 -134.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., Boor, K.J., 2000. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk. *Journal of Dairy Science* 83, 264-274.
- Meijering, A., Jaartveld, F.H., Verstegen, M.W., Tielen, M.J., 1978. The cell count of milk in relation to milk yield. *Journal of Dairy Research* 45, 5-14.
- Merle, R., Schröder, A., Hamann, J., 2007. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *Journal of Dairy Research* 74, 174-179.
- Mielke, H. 1994. Physiologie der Laktation, In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H., Fuchs, H.-W. (Eds.) *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Gustav Fischer Verlag Jena, Jena, 64-137.

- Milchgüte-Verordnung 2010. Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch. In Milchgüteverordnung vom 09.07.1980, letzte Änderung 2010
- Miller, R.H., Paape, M.J., Acton, J.C., 1986. Comparison of Milk Somatic Cell Counts by Coulter and Fossomatic Counters. *Journal of Dairy Science* 69, 1942-1946.
- Miller, R.H., Paape, M.J., Fulton, L.A., 1991. Variation in Milk Somatic Cells of Heifers at First Calving. *Journal of Dairy Science* 74, 3782-3790.
- Miller, R.H., Paape, M.J., Fulton, L.A., Schutz, M.M., 1993. The Relationship of for Holstein Heifers Milk Somatic Cell Count to Milk Yields After First Calving. *Journal of Dairy Science* 76, 728 - 733.
- Müller, U., Sauerwein, H., 2010. A comparison of somatic cell count between organic and conventional dairy cow herds in West Germany stressing dry period related changes. *Livestock Science* 127, 30-37.
- Nielsen, N.I., Larsen, T., Bjerring, M., Ingvarsen, K.L., 2005. Quarter Health, Milking Interval, and Sampling Time During Milking Affect the Concentration of Milk Constituents. *Journal of Dairy Science* 88, 3186-3200.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Veenstra, W., Berg, F.E., Stryhn, H., Zadoks, R.N., 2007. Somatic Cell Count During and Between Milkings. *Journal of Dairy Science* 90, 3733-3741.
- Ostensson, K., Hageltorn, M., Astrom, G., 1988. Differential Cell Counting In Fraction-Collected Milk From Dairy-cows. *Acta veterinaria Scandinavica* 29, 493-500.
- Paape, M., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.-W. 2003. The bovine neutrophil : structure and function in blood and milk (veterinary research), 597-627.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., Burvenich, C., 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 109-121.
- Paape, M.J., Schultze, W.D., Capuco, A.V., Astrom, G., 1985. Trafficking of leukocytes in the lactating bovine mammary gland. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 37, 622.
- Pearson, J.K.L., Greer, D.O., Stewart, D.A., 1974. Reproducibility of the electronic cell-count procedure for counting somatic cells in milk. *Journal of Dairy Research* 41, 193-201.
- Pearson, J.K.L., Wright, C.L., Greer, D.O., 1970. A study of methods for estimating the cell content of bulk milk. *Journal of Dairy Research* 37, 467-480.
- Pfeilsticker, H.U., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W., 1996. Cisternal milk in the dairy cow during lactation and after preceding teat stimulation. *Journal of Dairy Research* 63, 509-515.
- Phipps, L.W., Newbould, F.H.S., 1966. Determination of leucocyte concentrations in cow's milk with a Coulter counter. *Journal of Dairy Research* 33, 51-64.
- Piepers, S., De Vliegher, S., Demeyere, K., Lambrecht, B.N., de Kruif, A., Meyer, E., Opsomer, G., 2009. Technical note: Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. *Journal of Dairy Science* 92, 626-631.
- Pilla, R., Malvisi, M., Snel, G.G.M., Schwarz, D., König, S., Czerny, C.P., Piccinini, R., 2013. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science* 96, 1653-1660.
- Pilla, R., Schwarz, D., König, S., Piccinini, R., 2012. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science* 95, 4410-4420.
- Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M., 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *Journal of Dairy Science* 84, 1413-1420.

- Read Jr, R.B., Reyes, A.L., Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., 1967. Electronic Counting of Somatic Cells in Milk. *Journal of Dairy Science* 50, 669-674.
- Redelman, D., Butler, S., Robison, J., Garner, D., 1988. Identification of inflammatory cells in bovine-milk by flow-cytometry. *Cytometry* 9, 463-468.
- Reith, P., 2006. Die Immunantwort boviner und capriner Euterepithelzellen auf verschiedene Mastitiserreger. Dissertation. LMU München,
- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B., 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 161-167.
- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B., 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science* 84, 1077-1084.
- Rivas, A.L., Quimby, F.W., Blue, J., Coksaygan, O., 2001a. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 399-407.
- Rivas, A.L., Quimby, F.W., Coksaygan, O., Alba, A., Arina, A., Arrobas, M.J., González, R.N., Mohammed, H.O., Lein, D.H., 2001b. Expression of CD3 and CD11b antigens on blood and mammary gland leukocytes and bacterial survival in milk of cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *American Journal of Veterinary Research* 62, 1840-1851.
- Rivas, A.L., Tadevosyan, R., Gorewit, R.C., Anderson, K.L., Lyman, R., Gonzalez, R.N., 2006. Relationships between the phagocytic ability of milk macrophages and polymorphonuclear cells and somatic cell counts in uninfected cows. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 70, 68-74.
- Ryman, V.E., Packiriswamy, N., Sordillo, L.M., 2015. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Animal Health Research Rev.* 16, 135-149.
- Sarikaya, H., 2006. Somatic cell populations in milk: Importance in mammary gland physiology and behaviour during technological processing. Dissertation. Technische Universität München, München.
- Sarikaya, H., Bruckmaier, R.M., 2006. Importance of the sampled milk fraction for the prediction of total quarter somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 89, 4246-4250.
- Sarikaya, H., Schlamberger, G., Meyer, H.H.D., Bruckmaier, R.M., 2006. Leukocyte Populations and mRNA Expression of Inflammatory Factors in Quarter Milk Fractions at Different Somatic Cell Score Levels in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89, 2479-2486.
- Schröder, A., 2003. Untersuchungen zum Zelldifferentialbild in Milch und Blut unter Berücksichtigung des Gesundheitsstatus der bovinen Milchdrüse. Tierärztliche Hochschule Hannover,
- Schröder, A.C., Hamann, J., 2005. The influence of technical factors on differential cell count in milk. *Journal of Dairy Research* 72, 153-158.
- Schwarz, D., Diesterbeck, U.S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C.P., 2011a. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Research* 78, 448-455.
- Schwarz, D., Diesterbeck, U.S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C.P., 2011b. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* 94, 5033-5044.
- Schwarz, D., Rivas, A.L., König, S., Diesterbeck, U.S., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C.P., 2013. CD2/CD21 index: A new marker to evaluate udder health in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96, 5106-5119.

- Sheldrake, R.F., Hoare, R.J.T., Woodhouse, V.E., 1981. Relationship of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Research* 48, 393-403.
- Sladek, Z., Rysanek, D., Ryznarova, H., Faldyna, M., 2005. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Res.* 36, 629-643.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D., 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 80, 1851-1865.
- Sordillo, L.M., Streicher, K.L., 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 135-146.
- Sorg, D., Potzel, A., Beck, M., Meyer, H.H.D., Viturro, E., Kliem, H., 2012. Effects of cell culture techniques on gene expression and cholesterol efflux in primary bovine mammary epithelial cells derived from milk and tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* 48, 550-553.
- Stelwagen, K., Lacy-Hulbert, S., 1996. Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *American Journal of Veterinary Research* 57, 902-905.
- Swain, D.K., Kushwah, M.S., Mandheer, K., Dang, A.K., 2015. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World* 8, 336-345.
- Vangroenweghe, F., Dosogne, H., Burvenich, C., 2002. Composition and Milk Cell Characteristics in Quarter Milk Fractions of Dairy Cows with Low Cell Count. *The Veterinary Journal* 164, 254-260.
- Wagner, S.A., Jones, D.E., Apley, M.D., 2009. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 70, 796-799.
- Weiss, D.J., Wardrop, K.J., 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*, Vol 6. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Wellnitz, O., Doherr, M.G., Woloszyn, M., Bruckmaier, R.M., 2009. Prediction of total quarter milk somatic cell counts based on foremilk sampling. *Journal of Dairy Research* 76, 326-330.
- Wever, P., Emanuelson, U., 1989. Effects of systematic influences and intramammary infection on differential and total somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows. *Acta veterinaria Scandinavica* 30, 465-474.
- Winter, P., Burvenich, C., Hogeveen, H., Neijenhuis, F., Rasmussen, M., Schweigert, F., de Spiegeleer, B., Zehle, H., 2009. *Praktischer Leitfaden Mastitis*. Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG, Stuttgart.
- Yu, A.B., Zhao, G.Q., Tian, S.Q., Huo, Y.J., 2011. Relationship Between Parity and Cellular Composition of Somatic Cells in Milk of Chinese Holstein Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 2067-2073.
- Zoldan, K., Moellmer, T., Schneider, J., Fuedner, C., Knauer, J., Lehmann, J., 2014. Increase of CD25 expression on bovine neutrophils correlates with disease severity in post-partum and early lactating dairy cows. *Developmental and comparative immunology* 47, 254-263.

9. Anhang

Anhang 1

Zu Kapitel 4.3.2:

Vergleich der Partikelzahlen zwischen Doppelbestimmungen sowie dem SCC (Fossomatic™ 5000)

Probe	Status	SCC	Probe 1	Probe 2
		(Foss)	Partikelzahl (CC)	
138_01_01.#av	S	511	788,00	796,67
221_01_01.#av	G	80	148,00	128,00
221_067_früh_a	K	1300	186,00	202,00
221_107_spät_a	A	79	58,00	78,67
316_01_01.#av	G	87	234,00	218,00
331_01_01.#av	G	73	168,00	127,33
331_097_spät_a	K	609	321,33	396,00
348_01_01.#av	S	275	247,33	247,33
393_017_spät_a	A	88	100,67	113,33
393_01_01.#av	G	24	268,00	417,33
393_027_früh_a	A	48	3168,67	53,33
393_047_spät_a	N	93	91,33	72,00
393_057_früh_a	N	53	52,00	46,67
407_01_01.#av	G	24	84,67	62,67
455_087_spät_a	K	2500	1658,67	1649,33
455_167_früh_a	N	74	98,00	50,00
455_167_spät_a	N	108	86,00	68,67
460_01_01.#av	G	69	332,67	282,67
460_146_früh_a	K	7563,5	5437,33	5626,67
460_146_spät_a	K	10427	4636,00	4707,33
477_01_01.#av	G	64	103,33	92,00
524_01_01.#av	S	586	228,00	278,67
529_01_01.#av	G	60	166,00	217,33
532_146_spät_a	K	3174	2130,67	1842,00
560_01_01.#av	G	24	31,33	46,67
565_137_spät_a	K	482	272,00	292,00
578_01_01.#av	S	335	143,33	158,00
583_01_01.#av	G	20	100,00	85,33
597_01_01.#av	G	42	118,00	112,67
606_01_01.#av	G	29	84,00	94,67
615_01_01.#av	G	11	24,67	41,33
616_01_01.#av	G	63	3418,67	100,00
623_01_01.#av	G	84	78,67	68,67
653_167_spät_a	K	10136	1162,67	791,33
653_177_früh_a	K	4217	61,33	130,00

653_177_spät_a	K	7043	728,00	784,67
653_187_früh_a	K	10414	2216,67	2282,00
653_187_spät_a	K	15405	1617,33	1620,67
653_207_früh_a	K	20223	2429,33	2713,33
653_217_spät_a	K	17848	3776,67	4061,33
653_227_früh_a	K	2849	439,33	345,33
655_147_spät_a	K	2222	1508,00	1477,33
659_01_01.#av	G	85	274,67	184,00
674_01_01.#av	G	47	230,67	186,67
680_01_01.#av	G	57	81,33	58,67
683_01_01.#av	G	48	291,33	275,33
684_01_01.#av	G	41	36,67	54,00
685_01_01.#av	G	27	36,00	31,33
687_01_01.#av	G	35	35,33	62,67
689_01_01.#av	G	92	198,00	194,67
690_01_01.#av	G	93	53,33	70,67
692_01_01.#av	G	58	65,33	56,67
695_01_01.#av	G	92	80,00	74,00
699_01_01.#av	G	46	177,33	210,00
701_01_01.#av	G	48	24,67	28,67
722_01_01.#av	S	1941	1234,00	995,33
723_126_früh_a	K	3820	792,67	658,67
726_01_01.#av	G	62	130,67	66,00
727_01_01.#av	S	239	322,67	322,00
728_01_01.#av	G	72	120,67	108,67
730_01_01.#av	G	67	53,33	148,00
731_01_01.#av	G	67	104,67	104,00
733_01_01.#av	G	42	53,33	45,33
735_01_01.#av	G	36	60,67	71,33
736_01_01.#av	G	41	253,33	118,00
762_017_spät_a	A	80	134,00	170,00
762_027_früh_a	A	54	42,00	41,33
763_196_spät_a	K	7241	7023,34	7055,33

Anhang 2

Zu Kapitel 4.3.3 (Trainingsdatensatz):

Kennzahlen des Trainingsdatensatzes zur Erstellung der Algorithmen für die Erkennung des Gesundheitsstatus

Probe	Status	SCC	SCC	vorne	mitte	hinten	QVM	QVH	QVG	QMH	QMG	QHG
		Foss	Coulter Counter									
138_01_01.#av	S	511	788,00	312,67	222,00	21,33	1,41	14,66	0,40	10,41	0,28	0,03
138_02_01.#av	S	511	796,67	320,00	245,33	22,00	1,30	14,55	0,40	11,15	0,31	0,03
140_HG_01.#av	S	1766	311,33	33,33	104,67	44,00	0,32	0,76	0,11	2,38	0,34	0,14
221_01_01.#av	G	80	148,00	48,67	40,67	8,00	1,20	6,08	0,33	5,08	0,27	0,05
221_02_01.#av	G	80	128,00	50,67	38,00	6,67	1,33	7,60	0,40	5,70	0,30	0,05
221_067_früh_a	K	1300	186,00	58,00	43,33	27,33	1,34	2,12	0,31	1,59	0,23	0,15
221_067_früh_b	K	1300	202,00	48,67	61,33	26,67	0,79	1,83	0,24	2,30	0,30	0,13
316_01_01.#av	G	87	234,00	103,33	42,00	10,00	2,46	10,33	0,44	4,20	0,18	0,04
316_02_01.#av	G	87	218,00	78,67	54,00	5,33	1,46	14,75	0,36	10,13	0,25	0,02
331_01_01.#av	G	73	168,00	80,67	23,33	5,33	3,46	15,12	0,48	4,37	0,14	0,03
331_02_01.#av	G	73	127,33	71,33	12,00	3,33	5,94	21,40	0,56	3,60	0,09	0,03
331_097_spät_a	K	609	321,33	40,00	149,33	36,00	0,27	1,11	0,12	4,15	0,46	0,11
331_097_spät_b	K	609	396,00	61,33	164,67	36,00	0,37	1,70	0,15	4,57	0,42	0,09
331_HG_01.#av	S	1820	351,33	38,00	98,67	48,00	0,39	0,79	0,11	2,06	0,28	0,14
341_HG_01.#av	G	58	82,67	22,67	23,33	11,33	0,97	2,00	0,27	2,06	0,28	0,14
348_01_01.#av	S	275	247,33	41,33	102,67	20,67	0,40	2,00	0,17	4,97	0,42	0,08
348_02_01.#av	S	275	247,33	40,00	103,33	18,67	0,39	2,14	0,16	5,54	0,42	0,08
393_01_01.#av	G	24	268,00	108,67	50,67	16,00	2,14	6,79	0,41	3,17	0,19	0,06
393_02_01.#av	G	24	417,33	166,00	89,33	24,00	1,86	6,92	0,40	3,72	0,21	0,06
393_047_spät_a	K	93	91,33	45,33	14,67	4,67	3,09	9,71	0,50	3,14	0,16	0,05
393_047_spät_b	K	93	72,00	22,67	16,67	6,00	1,36	3,78	0,31	2,78	0,23	0,08
393_057_früh_a	K	53	52,00	8,00	28,67	5,33	0,28	1,50	0,15	5,37	0,55	0,10
393_057_früh_b	K	53	46,67	7,33	18,67	7,33	0,39	1,00	0,16	2,55	0,40	0,16
407_01_01.#av	G	24	84,67	37,33	15,33	1,33	2,43	28,00	0,44	11,50	0,18	0,02
407_02_01.#av	G	24	62,67	25,33	12,67	2,67	2,00	9,50	0,40	4,75	0,20	0,04
415_HG_01.#av	S	860	702,67	102,67	323,33	72,00	0,32	1,43	0,15	4,49	0,46	0,10
420_HG_01.#av	S	5721	2966,00	568,67	658,67	260,67	0,86	2,18	0,19	2,53	0,22	0,09
442_HG_01.#av	S	950	296,67	36,67	95,33	44,00	0,38	0,83	0,12	2,17	0,32	0,15
455_087_spät_a	K	2500	1658,67	258,67	707,33	140,67	0,37	1,84	0,16	5,03	0,43	0,08
455_087_spät_b	K	2500	1649,33	250,00	673,33	145,33	0,37	1,72	0,15	4,63	0,41	0,09
455_167_früh_a	K	74	98,00	58,00	16,67	0,67	3,48	87,00	0,59	25,00	0,17	0,01
455_167_früh_b	K	74	50,00	10,67	19,33	2,67	0,55	4,00	0,21	7,25	0,39	0,05
455_167_spät_a	K	108	86,00	18,00	31,33	3,33	0,57	5,40	0,21	9,40	0,36	0,04
455_167_spät_b	K	108	68,67	16,67	24,67	3,33	0,68	5,00	0,24	7,40	0,36	0,05
457_HG_01.#av	S	3220	1379,33	176,00	482,67	189,33	0,36	0,93	0,13	2,55	0,35	0,14
460_01_01.#av	G	69	332,67	151,33	70,00	17,33	2,16	8,73	0,45	4,04	0,21	0,05
460_02_01.#av	G	69	282,67	133,33	42,67	14,00	3,12	9,52	0,47	3,05	0,15	0,05
477_01_01.#av	G	64	103,33	32,67	35,33	6,67	0,92	4,90	0,32	5,30	0,34	0,06
477_02_01.#av	G	64	92,00	30,67	29,33	4,67	1,05	6,57	0,33	6,29	0,32	0,05
483_HG_01.#av	S	1961	1240,67	176,00	326,67	134,00	0,54	1,31	0,14	2,44	0,26	0,11
524_01_01.#av	S	586	228,00	34,67	84,67	30,67	0,41	1,13	0,15	2,76	0,37	0,13
524_02_01.#av	S	586	278,67	43,33	99,33	38,00	0,44	1,14	0,16	2,61	0,36	0,14
529_01_01.#av	G	60	166,00	81,33	26,67	5,33	3,05	15,25	0,49	5,00	0,16	0,03
529_02_01.#av	G	60	217,33	105,33	32,00	10,67	3,29	9,88	0,48	3,00	0,15	0,05
560_01_01.#av	G	24	31,33	9,33	8,00	2,67	1,17	3,50	0,30	3,00	0,26	0,09
560_02_01.#av	G	24	46,67	18,00	6,00	7,33	3,00	2,45	0,39	0,82	0,13	0,16
565_137_spät_a	K	482	272,00	31,33	144,00	20,00	0,22	1,57	0,12	7,20	0,53	0,07
565_137_spät_b	K	482	292,00	25,33	153,33	24,67	0,17	1,03	0,09	6,22	0,53	0,08
578_01_01.#av	S	335	143,33	14,67	37,33	21,33	0,39	0,69	0,10	1,75	0,26	0,15
578_02_01.#av	S	335	158,00	19,33	52,67	26,00	0,37	0,74	0,12	2,03	0,33	0,16

583_01_01.#av	G	20	100,00	34,67	26,67	7,33	1,30	4,73	0,35	3,64	0,27	0,07
583_02_01.#av	G	20	85,33	32,67	20,00	4,00	1,63	8,17	0,38	5,00	0,23	0,05
597_01_01.#av	G	42	118,00	44,00	20,67	12,67	2,13	3,47	0,37	1,63	0,18	0,11
597_02_01.#av	G	42	112,67	38,00	26,00	6,67	1,46	5,70	0,34	3,90	0,23	0,06
606_01_01.#av	G	29	84,00	43,33	17,33	4,67	2,50	9,29	0,52	3,71	0,21	0,06
606_02_01.#av	G	29	94,67	45,33	14,67	7,33	3,09	6,18	0,48	2,00	0,15	0,08
615_01_01.#av	G	11	24,67	15,33	4,67	0,67	3,29	23,00	0,62	7,00	0,19	0,03
615_02_01.#av	G	11	41,33	18,00	10,00	0,67	1,80	27,00	0,44	15,00	0,24	0,02
616_01_01.#av	G	63	3418,67	2873,34	66,67	4,00	43,10	718,33	0,84	16,67	0,02	0,00
616_02_01.#av	G	63	100,00	32,00	30,67	6,00	1,04	5,33	0,32	5,11	0,31	0,06
623_01_01.#av	G	84	78,67	20,67	28,67	6,00	0,72	3,44	0,26	4,78	0,36	0,08
623_02_01.#av	G	84	68,67	16,67	25,33	4,00	0,66	4,17	0,24	6,33	0,37	0,06
629_HG_01.#av	G	54	46,00	11,33	7,33	7,33	1,55	1,55	0,25	1,00	0,16	0,16
653_167_spät_a	K	10136	1162,67	140,00	643,33	87,33	0,22	1,60	0,12	7,37	0,55	0,08
653_167_spät_b	K	10136	791,33	78,67	450,00	74,00	0,17	1,06	0,10	6,08	0,57	0,09
653_177_früh_a	K	4217	61,33	15,33	21,33	3,33	0,72	4,60	0,25	6,40	0,35	0,05
653_177_früh_b	K	4217	130,00	22,67	52,00	6,67	0,44	3,40	0,17	7,80	0,40	0,05
653_177_spät_a	K	7043	728,00	167,33	297,33	56,67	0,56	2,95	0,23	5,25	0,41	0,08
653_177_spät_b	K	7043	784,67	186,00	306,67	63,33	0,61	2,94	0,24	4,84	0,39	0,08
653_187_früh_a	K	10414	2216,67	418,67	854,67	300,00	0,49	1,40	0,19	2,85	0,39	0,14
653_187_früh_b	K	10414	2282,00	467,33	844,67	285,33	0,55	1,64	0,20	2,96	0,37	0,13
653_187_spät_a	K	15405	1617,33	235,33	638,00	204,67	0,37	1,15	0,15	3,12	0,39	0,13
653_187_spät_b	K	15405	1620,67	258,00	651,33	186,67	0,40	1,38	0,16	3,49	0,40	0,12
653_207_früh_a	K	20223	2429,33	234,67	1374,00	240,00	0,17	0,98	0,10	5,73	0,57	0,10
653_207_früh_b	K	20223	2713,33	330,67	1511,33	241,33	0,22	1,37	0,12	6,26	0,56	0,09
653_217_spät_a	K	17848	3776,67	948,00	1433,33	158,00	0,66	6,00	0,25	9,07	0,38	0,04
653_217_spät_b	K	17848	4061,33	1013,33	1516,67	184,67	0,67	5,49	0,25	8,21	0,37	0,05
653_227_früh_a	K	2849	439,33	119,33	104,67	52,00	1,14	2,29	0,27	2,01	0,24	0,12
653_227_früh_b	K	2849	345,33	84,67	87,33	46,00	0,97	1,84	0,25	1,90	0,25	0,13
655_147_spät_a	K	2222	1508,00	91,33	684,00	268,67	0,13	0,34	0,06	2,55	0,45	0,18
655_147_spät_b	K	2222	1477,33	80,67	648,67	297,33	0,12	0,27	0,05	2,18	0,44	0,20
655_HG_01.#av	S	812	302,67	55,33	74,67	57,33	0,74	0,97	0,18	1,30	0,25	0,19
657_HG_01.#av	G	17	20,67	7,33	1,33	1,33	5,50	5,50	0,35	1,00	0,06	0,06
658_HG_01.#av	G	96	34,67	16,00	4,67	3,33	3,43	4,80	0,46	1,40	0,13	0,10
659_01_01.#av	G	85	274,67	106,00	62,67	15,33	1,69	6,91	0,39	4,09	0,23	0,06
659_02_01.#av	G	85	184,00	60,00	44,00	16,00	1,36	3,75	0,33	2,75	0,24	0,09
667_HG_01.#av	G	44	56,00	14,67	15,33	7,33	0,96	2,00	0,26	2,09	0,27	0,13
669_HG_01.#av	G	51	30,67	6,67	4,00	2,67	1,67	2,50	0,22	1,50	0,13	0,09
672_HG_01.#av	S	1277	601,33	72,67	196,00	131,33	0,37	0,55	0,12	1,49	0,33	0,22
674_01_01.#av	G	47	230,67	56,67	74,00	20,67	0,77	2,74	0,25	3,58	0,32	0,09
674_02_01.#av	G	47	186,67	62,67	55,33	14,67	1,13	4,27	0,34	3,77	0,30	0,08
679_HG_01.#av	G	36	29,33	7,33	6,00	1,33	1,22	5,50	0,25	4,50	0,20	0,05
680_01_01.#av	G	57	81,33	22,00	22,67	5,33	0,97	4,13	0,27	4,25	0,28	0,07
680_02_01.#av	G	57	58,67	17,33	20,00	3,33	0,87	5,20	0,30	6,00	0,34	0,06
683_01_01.#av	G	48	291,33	73,33	96,67	26,67	0,76	2,75	0,25	3,63	0,33	0,09
683_02_01.#av	G	48	275,33	65,33	86,67	26,00	0,75	2,51	0,24	3,33	0,31	0,09
684_01_01.#av	G	41	36,67	10,00	8,67	4,67	1,15	2,14	0,27	1,86	0,24	0,13
684_02_01.#av	G	41	54,00	20,00	10,67	6,00	1,87	3,33	0,37	1,78	0,20	0,11
685_01_01.#av	G	27	36,00	14,00	10,67	2,00	1,31	7,00	0,39	5,33	0,30	0,06
685_02_01.#av	G	27	31,33	12,67	7,33	2,00	1,73	6,33	0,40	3,67	0,23	0,06
687_01_01.#av	G	35	35,33	8,67	11,33	2,67	0,76	3,25	0,25	4,25	0,32	0,08
687_02_01.#av	G	35	62,67	20,00	16,67	2,67	1,20	7,50	0,32	6,25	0,27	0,04
689_01_01.#av	G	92	198,00	68,67	52,67	18,67	1,30	3,68	0,35	2,82	0,27	0,09
689_02_01.#av	G	92	194,67	65,33	60,00	14,67	1,09	4,45	0,34	4,09	0,31	0,08
690_01_01.#av	G	93	53,33	22,67	15,33	1,33	1,48	17,00	0,43	11,50	0,29	0,03
690_02_01.#av	G	93	70,67	25,33	13,33	1,33	1,90	19,00	0,36	10,00	0,19	0,02
692_01_01.#av	G	58	65,33	17,33	20,00	6,00	0,87	2,89	0,27	3,33	0,31	0,09
692_02_01.#av	G	58	56,67	12,67	16,67	6,00	0,76	2,11	0,22	2,78	0,29	0,11
692_HG_01.#av	S	3715	1550,67	221,33	370,67	168,67	0,60	1,31	0,14	2,20	0,24	0,11
695_01_01.#av	G	92	80,00	19,33	19,33	5,33	1,00	3,62	0,24	3,62	0,24	0,07

695_02_01.#av	G	92	74,00	14,67	26,67	6,67	0,55	2,20	0,20	4,00	0,36	0,09
699_01_01.#av	G	46	177,33	48,00	42,00	12,00	1,14	4,00	0,27	3,50	0,24	0,07
699_02_01.#av	G	46	210,00	66,67	48,67	17,33	1,37	3,85	0,32	2,81	0,23	0,08
701_01_01.#av	G	48	24,67	8,00	4,67	1,33	1,71	6,00	0,32	3,50	0,19	0,05
701_02_01.#av	G	48	28,67	7,33	6,67	0,67	1,10	11,00	0,26	10,00	0,23	0,02
710_HG_01.#av	S	203	164,67	42,67	28,67	20,67	1,49	2,06	0,26	1,39	0,17	0,13
722_01_01.#av	S	1941	1234,00	236,67	359,33	152,00	0,66	1,56	0,19	2,36	0,29	0,12
722_02_01.#av	S	1941	995,33	166,00	305,33	148,00	0,54	1,12	0,17	2,06	0,31	0,15
726_01_01.#av	G	62	130,67	52,00	29,33	6,67	1,77	7,80	0,40	4,40	0,22	0,05
726_02_01.#av	G	62	66,00	26,67	12,67	4,67	2,11	5,71	0,40	2,71	0,19	0,07
727_01_01.#av	S	239	322,67	94,67	80,67	26,00	1,17	3,64	0,29	3,10	0,25	0,08
727_02_01.#av	S	239	322,00	98,67	90,67	24,00	1,09	4,11	0,31	3,78	0,28	0,07
728_01_01.#av	G	72	120,67	32,00	28,00	17,33	1,14	1,85	0,27	1,62	0,23	0,14
728_02_01.#av	G	72	108,67	41,33	21,33	9,33	1,94	4,43	0,38	2,29	0,20	0,09
730_01_01.#av	G	67	53,33	27,33	8,67	1,33	3,15	20,50	0,51	6,50	0,16	0,03
730_02_01.#av	G	67	148,00	62,67	32,67	9,33	1,92	6,71	0,42	3,50	0,22	0,06
731_01_01.#av	G	67	104,67	41,33	22,67	12,67	1,82	3,26	0,39	1,79	0,22	0,12
731_02_01.#av	G	67	104,00	39,33	26,00	6,00	1,51	6,56	0,38	4,33	0,25	0,06
733_01_01.#av	G	42	53,33	27,33	9,33	4,00	2,93	6,83	0,51	2,33	0,17	0,07
733_02_01.#av	G	42	45,33	12,00	10,67	2,00	1,12	6,00	0,26	5,33	0,24	0,04
735_01_01.#av	G	36	60,67	26,67	14,67	2,67	1,82	10,00	0,44	5,50	0,24	0,04
735_02_01.#av	G	36	71,33	29,33	11,33	2,67	2,59	11,00	0,41	4,25	0,16	0,04
736_01_01.#av	G	41	253,33	88,00	64,00	19,33	1,38	4,55	0,35	3,31	0,25	0,08
736_02_01.#av	G	41	118,00	58,00	22,00	5,33	2,64	10,88	0,49	4,13	0,19	0,05
763_196_spät_a	K	7241	7023,34	574,67	4324,00	231,33	0,13	2,48	0,08	18,69	0,62	0,03
763_196_spät_b	K	7241	7055,33	535,33	4359,33	284,67	0,12	1,88	0,08	15,31	0,62	0,04
AA_01_01.#av	G	20	336,67	224,67	32,00	4,00	7,02	56,17	0,67	8,00	0,10	0,01
AA_01_01.#av	S	340	193,33	47,33	67,33	6,67	0,70	7,10	0,24	10,10	0,35	0,03
AA_02_01.#av	G	20	199,33	137,33	16,67	4,00	8,24	34,33	0,69	4,17	0,08	0,02
AA_02_01.#av	S	340	193,33	30,00	84,00	4,67	0,36	6,43	0,16	18,00	0,43	0,02
AA_03_01.#av	G	20	231,33	153,33	20,67	4,00	7,42	38,33	0,66	5,17	0,09	0,02
AA_03_01.#av	S	340	184,00	42,00	65,33	8,67	0,64	4,85	0,23	7,54	0,36	0,05
AA_04_01.#av	G	20	182,67	112,00	23,33	5,33	4,80	21,00	0,61	4,38	0,13	0,03
AA_04_01.#av	S	340	193,33	42,00	66,00	5,33	0,64	7,87	0,22	12,38	0,34	0,03
AA_05_01.#av	G	20	251,33	182,00	20,00	2,67	9,10	68,25	0,72	7,50	0,08	0,01
AA_05_01.#av	S	340	208,00	52,00	65,33	12,00	0,80	4,33	0,25	5,44	0,31	0,06
AA_06_01.#av	G	20	247,33	164,00	16,67	7,33	9,84	22,36	0,66	2,27	0,07	0,03
AA_06_01.#av	S	340	157,33	35,33	61,33	8,00	0,58	4,42	0,22	7,67	0,39	0,05
AA_07_01.#av	G	20	379,33	236,00	42,00	10,67	5,62	22,12	0,62	3,94	0,11	0,03
AA_07_01.#av	S	340	170,00	36,67	55,33	8,00	0,66	4,58	0,22	6,92	0,33	0,05
AA_08_01.#av	G	20	236,67	155,33	24,00	7,33	6,47	21,18	0,66	3,27	0,10	0,03
AA_08_01.#av	S	340	173,33	38,00	58,67	10,00	0,65	3,80	0,22	5,87	0,34	0,06
AA_09_01.#av	G	20	305,33	207,33	31,33	6,67	6,62	31,10	0,68	4,70	0,10	0,02
AA_10_01.#av	G	20	276,00	165,33	29,33	8,67	5,64	19,08	0,60	3,38	0,11	0,03
BB_01_01.#av	G	41,5	470,00	274,00	74,00	12,67	3,70	21,63	0,58	5,84	0,16	0,03
BB_01_01.#av	S	295	372,00	165,33	73,33	18,67	2,25	8,86	0,44	3,93	0,20	0,05
BB_02_01.#av	G	41,5	558,67	352,00	61,33	10,67	5,74	33,00	0,63	5,75	0,11	0,02
BB_02_01.#av	S	295	421,33	168,67	68,67	42,00	2,46	4,02	0,40	1,63	0,16	0,10
BB_03_01.#av	G	41,5	192,67	103,33	30,00	6,00	3,44	17,22	0,54	5,00	0,16	0,03
BB_03_01.#av	S	295	421,33	165,33	82,00	44,67	2,02	3,70	0,39	1,84	0,19	0,11
BB_04_01.#av	G	41,5	202,67	107,33	33,33	8,00	3,22	13,42	0,53	4,17	0,16	0,04
BB_04_01.#av	S	295	387,33	153,33	77,33	31,33	1,98	4,89	0,40	2,47	0,20	0,08
BB_05_01.#av	G	41,5	422,67	263,33	53,33	7,33	4,94	35,91	0,62	7,27	0,13	0,02
BB_05_01.#av	S	295	404,67	170,67	76,67	38,00	2,23	4,49	0,42	2,02	0,19	0,09
BB_06_01.#av	G	41,5	491,33	306,67	54,67	4,67	5,61	65,71	0,62	11,71	0,11	0,01
BB_06_01.#av	S	295	466,67	194,67	76,00	51,33	2,56	3,79	0,42	1,48	0,16	0,11
BB_07_01.#av	G	41,5	480,00	294,67	64,67	8,00	4,56	36,83	0,61	8,08	0,13	0,02
BB_07_01.#av	S	295	454,00	177,33	90,00	50,67	1,97	3,50	0,39	1,78	0,20	0,11
BB_08_01.#av	G	41,5	391,33	242,67	43,33	10,67	5,60	22,75	0,62	4,06	0,11	0,03
BB_08_01.#av	S	295	352,00	152,67	76,67	20,00	1,99	7,63	0,43	3,83	0,22	0,06

BB_09_01.#av	G	41,5	317,33	190,00	40,00	9,33	4,75	20,36	0,60	4,29	0,13	0,03
BB_10_01.#av	G	41,5	326,67	195,33	42,67	10,67	4,58	18,31	0,60	4,00	0,13	0,03
CC_01_01.#av	G	50	55,33	22,67	12,67	6,00	1,79	3,78	0,41	2,11	0,23	0,11
CC_01_01.#av	S	231	161,33	39,33	39,33	26,00	1,00	1,51	0,24	1,51	0,24	0,16
CC_02_01.#av	G	50	76,67	32,67	10,67	7,33	3,06	4,45	0,43	1,45	0,14	0,10
CC_02_01.#av	S	231	135,33	22,67	39,33	20,67	0,58	1,10	0,17	1,90	0,29	0,15
CC_03_01.#av	G	50	66,00	20,67	10,67	5,33	1,94	3,87	0,31	2,00	0,16	0,08
CC_03_01.#av	S	231	133,33	34,00	39,33	18,67	0,86	1,82	0,25	2,11	0,29	0,14
CC_04_01.#av	G	50	64,00	25,33	12,00	8,00	2,11	3,17	0,40	1,50	0,19	0,12
CC_04_01.#av	S	231	130,67	33,33	27,33	24,67	1,22	1,35	0,26	1,11	0,21	0,19
CC_05_01.#av	G	50	51,33	19,33	11,33	4,67	1,71	4,14	0,38	2,43	0,22	0,09
CC_05_01.#av	S	231	174,00	43,33	46,67	21,33	0,93	2,03	0,25	2,19	0,27	0,12
CC_06_01.#av	G	50	78,00	34,00	11,33	7,33	3,00	4,64	0,44	1,55	0,15	0,09
CC_06_01.#av	S	231	126,67	31,33	40,00	18,67	0,78	1,68	0,25	2,14	0,32	0,15
CC_07_01.#av	G	50	84,00	32,67	13,33	10,67	2,45	3,06	0,39	1,25	0,16	0,13
CC_07_01.#av	S	231	127,33	24,00	38,00	18,00	0,63	1,33	0,19	2,11	0,30	0,14
CC_08_01.#av	G	50	58,00	19,33	10,00	4,00	1,93	4,83	0,33	2,50	0,17	0,07
CC_08_01.#av	S	231	134,67	26,00	44,00	14,67	0,59	1,77	0,19	3,00	0,33	0,11
CC_09_01.#av	S	231	118,67	26,00	39,33	9,33	0,66	2,79	0,22	4,21	0,33	0,08
CC_10_01.#av	S	231	130,67	29,33	42,00	23,33	0,70	1,26	0,22	1,80	0,32	0,18
CC_01.#av	G	48	41,33	14,67	10,00	2,00	1,47	7,33	0,35	5,00	0,24	0,05
DD_01_01.#av	G	34	63,33	29,33	11,33	1,33	2,59	22,00	0,46	8,50	0,18	0,02
DD_01_01.#av	S	260	434,00	202,00	84,00	22,00	2,40	9,18	0,47	3,82	0,19	0,05
DD_02_01.#av	G	34	74,00	41,33	11,33	0,67	3,65	62,00	0,56	17,00	0,15	0,01
DD_02_01.#av	S	260	468,00	214,67	91,33	26,67	2,35	8,05	0,46	3,43	0,20	0,06
DD_03_01.#av	G	34	49,33	32,00	4,00	0,67	8,00	48,00	0,65	6,00	0,08	0,01
DD_03_01.#av	S	260	386,00	179,33	75,33	26,67	2,38	6,73	0,46	2,83	0,20	0,07
DD_04_01.#av	G	34	70,00	38,67	7,33	2,00	5,27	19,33	0,55	3,67	0,10	0,03
DD_04_01.#av	S	260	398,67	178,00	78,00	24,00	2,28	7,42	0,45	3,25	0,20	0,06
DD_05_01.#av	G	34	52,67	32,00	5,33	0,67	6,00	48,00	0,61	8,00	0,10	0,01
DD_05_01.#av	S	260	452,67	199,33	92,67	30,67	2,15	6,50	0,44	3,02	0,20	0,07
DD_06_01.#av	G	34	63,33	31,33	8,00	3,33	3,92	9,40	0,49	2,40	0,13	0,05
DD_06_01.#av	S	260	436,67	194,67	80,00	28,67	2,43	6,79	0,45	2,79	0,18	0,07
DD_07_01.#av	G	34	60,00	39,33	8,67	0,67	4,54	59,00	0,66	13,00	0,14	0,01
DD_07_01.#av	S	260	442,00	199,33	97,33	33,33	2,05	5,98	0,45	2,92	0,22	0,08
DD_08_01.#av	G	34	72,00	41,33	8,67	0,67	4,77	62,00	0,57	13,00	0,12	0,01
DD_08_01.#av	S	260	410,67	190,67	81,33	31,33	2,34	6,09	0,46	2,60	0,20	0,08
DD_09_01.#av	S	260	444,00	197,33	82,67	28,67	2,39	6,88	0,44	2,88	0,19	0,06
DD_10_01.#av	S	260	458,00	213,33	82,67	27,33	2,58	7,80	0,47	3,02	0,18	0,06
DD_01.#av	G	25	22,00	12,67	2,67	0,67	4,75	19,00	0,58	4,00	0,12	0,03
EE_01.#av	G	46	50,67	22,67	13,33	1,33	1,70	17,00	0,45	10,00	0,26	0,03
FF_01_01.#av	S	357	170,67	50,67	45,33	17,33	1,12	2,92	0,30	2,62	0,27	0,10
FF_02_01.#av	S	357	258,00	100,67	58,67	12,67	1,72	7,95	0,39	4,63	0,23	0,05
FF_03_01.#av	S	357	167,33	44,67	57,33	11,33	0,78	3,94	0,27	5,06	0,34	0,07
FF_04_01.#av	S	357	220,00	95,33	48,00	14,00	1,99	6,81	0,43	3,43	0,22	0,06
FF_05_01.#av	S	357	249,33	101,33	56,00	16,67	1,81	6,08	0,41	3,36	0,22	0,07
FF_06_01.#av	S	357	169,33	61,33	43,33	18,00	1,42	3,41	0,36	2,41	0,26	0,11
FF_07_01.#av	S	357	196,67	68,00	54,67	14,00	1,24	4,86	0,35	3,90	0,28	0,07
FF_08_01.#av	S	357	162,00	49,33	44,67	13,33	1,10	3,70	0,30	3,35	0,28	0,08
FF_09_01.#av	S	357	818,00	428,00	120,00	33,33	3,57	12,84	0,52	3,60	0,15	0,04
FF_10_01.#av	S	357	274,00	103,33	70,00	13,33	1,48	7,75	0,38	5,25	0,26	0,05
GG_01_01.#av	G	10	46,00	18,67	11,33	0,67	1,65	28,00	0,41	17,00	0,25	0,01
GG_02_01.#av	G	10	20,67	7,33	2,00	2,00	3,67	3,67	0,35	1,00	0,10	0,10
GG_03_01.#av	G	10	29,33	12,67	6,67	0,67	1,90	19,00	0,43	10,00	0,23	0,02
GG_04_01.#av	G	10	23,33	8,00	5,33	2,00	1,50	4,00	0,34	2,67	0,23	0,09
GG_05_01.#av	G	10	26,67	13,33	7,33	0,67	1,82	20,00	0,50	11,00	0,28	0,03
GG_06_01.#av	G	10	36,00	14,67	7,33	2,67	2,00	5,50	0,41	2,75	0,20	0,07
GG_07_01.#av	G	10	28,00	14,67	3,33	2,00	4,40	7,33	0,52	1,67	0,12	0,07
GG_08_01.#av	G	10	34,67	17,33	6,67	1,33	2,60	13,00	0,50	5,00	0,19	0,04
G_01.#av	K	3533	2036,67	263,33	1145,33	122,67	0,23	2,15	0,13	9,34	0,56	0,06

HH_01.#av	G	29	42,67	23,33	3,33	2,00	7,00	11,67	0,55	1,67	0,08	0,05
II_01.#av	G	25	171,33	127,33	11,33	4,00	11,24	31,83	0,74	2,83	0,07	0,02
JJ_01.#av	S	924	130,67	16,00	44,00	24,67	0,36	0,65	0,12	1,78	0,34	0,19
Milch_A_01.#a	K	2533	2068,67	896,67	308,67	170,00	2,90	5,27	0,43	1,82	0,15	0,08
Milch_C_01.#a	K	5684	2354,67	134,67	1460,67	144,00	0,09	0,94	0,06	10,14	0,62	0,06
Milch_D_01.#a	K	13667	10420,66	2001,33	4684,67	452,67	0,43	4,42	0,19	10,35	0,45	0,04
Milch_E_01.#a	K	4807	1225,33	167,33	660,67	84,00	0,25	1,99	0,14	7,87	0,54	0,07

Status: identifizierter Gesundheitsstatus (g:gesund, s:subklinisch erkrankt, k: klinisch erkrankt)

SCC Foss: somatische Zellzahl mittels FossomaticTM 5000 bestimmt

Vorne, mitte, hinten: Lage des kritischen Bereichs der Zellgrößenverteilung

Q: Quotient

V: vorderer kritischer Bereich \triangleq vorne

M: mittlerer kritischer Bereich \triangleq mitte

H: hinterer kritischer Bereich \triangleq hinten

Anhang 3

Zu Kapitel 4.3.3 (Testdatensatz):

Kennzahlen des Testdatensatzes zur Überprüfung der Algorithmen für die Erkennung des Gesundheitsstatus

Probe	Status	SCC	V	M	H	G	QVM	QVH	QVG	QMH	QMG	QHG
		Foss	Coulter Counter									
Milch_01_1_01.#av	g	72	25,33	26,00	4,67	82,67	0,97	5,43	0,31	5,57	0,31	0,06
Milch_01_2_01.#av	g	72	23,33	30,67	4,67	88,67	0,76	5,00	0,26	6,57	0,35	0,05
Milch_03_1_01.#av	g	40	12,00	14,00	4,67	50,00	0,86	2,57	0,24	3,00	0,28	0,09
Milch_03_2_01.#av	g	40	60,67	18,67	4,00	110,00	3,25	15,17	0,55	4,67	0,17	0,04
Milch_04_1_01.#av	g	20	22,00	14,00	8,00	60,67	1,57	2,75	0,36	1,75	0,23	0,13
Milch_04_2_01.#av	g	20	64,67	30,67	7,33	150,67	2,11	8,82	0,43	4,18	0,20	0,05
Milch_05_1_01.#av	s	1316	205,33	272,00	53,33	904,67	0,75	3,85	0,23	5,10	0,30	0,06
Milch_05_2_01.#av	s	1316	186,00	264,67	48,00	868,67	0,70	3,88	0,21	5,51	0,30	0,06
Milch_06_1_01.#av	s	2725	135,33	328,67	86,67	934,00	0,41	1,56	0,14	3,79	0,35	0,09
Milch_06_2_01.#av	s	2725	136,00	326,67	93,33	926,00	0,42	1,46	0,15	3,50	0,35	0,10
Milch_08_1_01.#av	g	57	11,33	18,00	5,33	54,00	0,63	2,12	0,21	3,38	0,33	0,10
Milch_08_2_01.#av	g	57	16,00	27,33	6,00	74,00	0,59	2,67	0,22	4,56	0,37	0,08
Milch_09_1_01.#av	g	28	10,00	10,67	7,33	44,67	0,94	1,36	0,22	1,45	0,24	0,16
Milch_09_2_01.#av	g	28	16,67	11,33	4,00	50,67	1,47	4,17	0,33	2,83	0,22	0,08
Milch_10_1_01.#av	g	37	16,00	18,67	2,00	55,33	0,86	8,00	0,29	9,33	0,34	0,04
Milch_10_2_01.#av	g	37	11,33	14,67	4,67	47,33	0,77	2,43	0,24	3,14	0,31	0,10
Milch_11_1_01.#av	s	449	43,33	170,00	12,67	312,67	0,25	3,42	0,14	13,42	0,54	0,04
Milch_11_2_01.#av	s	449	52,67	170,00	16,00	344,67	0,31	3,29	0,15	10,63	0,49	0,05
Milch_12_1_01.#av	g	38	13,33	9,33	5,33	49,33	1,43	2,50	0,27	1,75	0,19	0,11
Milch_12_2_01.#av	g	38	14,00	9,33	6,00	50,00	1,50	2,33	0,28	1,56	0,19	0,12
Milch_14_1_01.#av	g	37	15,33	15,33	5,33	66,00	1,00	2,88	0,23	2,88	0,23	0,08
Milch_14_2_01.#av	g	37	15,33	13,33	3,33	52,00	1,15	4,60	0,29	4,00	0,26	0,06
Milch_15_1_01.#av	s	2528	116,00	290,00	56,67	737,33	0,40	2,05	0,16	5,12	0,39	0,08
Milch_15_2_01.#av	s	2528	134,00	308,00	40,67	751,33	0,44	3,30	0,18	7,57	0,41	0,05
Milch_16_1_01.#av	s	1307	56,67	158,67	41,33	372,67	0,36	1,37	0,15	3,84	0,43	0,11
Milch_16_2_01.#av	s	1307	60,67	185,33	38,00	404,67	0,33	1,60	0,15	4,88	0,46	0,09
Milch_18_1_01.#av	g	33	8,67	6,67	2,67	33,33	1,30	3,25	0,26	2,50	0,20	0,08
Milch_18_2_01.#av	g	33	18,67	10,00	6,00	53,33	1,87	3,11	0,35	1,67	0,19	0,11
Milch_21_1_01.#av	s	579	54,00	147,33	20,00	363,33	0,37	2,70	0,15	7,37	0,41	0,06
Milch_21_2_01.#av	s	579	69,33	121,33	22,00	349,33	0,57	3,15	0,20	5,52	0,35	0,06
Milch_23_1_01.#av	g	25	26,00	15,33	8,00	65,33	1,70	3,25	0,40	1,92	0,23	0,12
Milch_23_2_01.#av	g	25	28,67	16,67	4,67	68,00	1,72	6,14	0,42	3,57	0,25	0,07
Milch_24_1_01.#av	g	70	21,33	31,33	8,67	98,00	0,68	2,46	0,22	3,62	0,32	0,09
Milch_24_2_01.#av	g	70	19,33	26,00	6,00	79,33	0,74	3,22	0,24	4,33	0,33	0,08
Milch_26_1_01.#av	g	45	14,00	6,67	2,67	40,67	2,10	5,25	0,34	2,50	0,16	0,07
Milch_26_2_01.#av	g	45	12,00	6,00	2,00	34,00	2,00	6,00	0,35	3,00	0,18	0,06

Milch 27 1 01.#av	g	38	21,33	8,00	4,67	48,00	2,67	4,57	0,44	1,71	0,17	0,10
Milch 27 2 01.#av	g	38	25,33	4,67	2,00	52,00	5,43	12,67	0,49	2,33	0,09	0,04
Milch 30 1 01.#av	g	13	6,67	2,67	2,00	15,33	2,50	3,33	0,43	1,33	0,17	0,13
Milch 30 2 01.#av	g	13	6,00	2,67	0,00	13,33	2,25		0,45		0,20	0,00
Milch 31 1 01.#av	g	54	18,00	19,33	6,67	69,33	0,93	2,70	0,26	2,90	0,28	0,10
Milch 31 2 01.#av	g	54	16,00	20,67	4,00	63,33	0,77	4,00	0,25	5,17	0,33	0,06
Milch 33 1 01.#av	g	74	18,67	7,33	2,67	44,67	2,55	7,00	0,42	2,75	0,16	0,06
Milch 33 2 01.#av	g	74	26,00	10,00	1,33	58,00	2,60	19,50	0,45	7,50	0,17	0,02
Milch 35 1 01.#av	g	41	9,33	11,33	2,67	40,00	0,82	3,50	0,23	4,25	0,28	0,07
Milch 35 2 01.#av	g	41	18,00	8,67	4,00	46,67	2,08	4,50	0,39	2,17	0,19	0,09
Milch 38 1 01.#av	s	1537	27,33	676,67	48,00	912,00	0,04	0,57	0,03	14,10	0,74	0,05
Milch 38 2 01.#av	s	1537	20,00	588,00	43,33	760,00	0,03	0,46	0,03	13,57	0,77	0,06
Milch 39 1 01.#av	g	23	10,67	7,33	3,33	29,33	1,45	3,20	0,36	2,20	0,25	0,11
Milch 39 2 01.#av	g	23	12,00	7,33	3,33	32,67	1,64	3,60	0,37	2,20	0,22	0,10
Milch 40 1 01.#av	g	78	12,00	10,67	2,00	35,33	1,12	6,00	0,34	5,33	0,30	0,06
Milch 40 2 01.#av	g	78	10,00	12,00	0,00	35,33	0,83		0,28		0,34	0,00
Milch 42 1 01.#av	g	55	20,00	14,67	8,00	57,33	1,36	2,50	0,35	1,83	0,26	0,14
Milch 42 2 01.#av	g	55	15,33	18,00	5,33	54,00	0,85	2,88	0,28	3,38	0,33	0,10
Milch 43 1 01.#av	g	49	15,33	16,00	5,33	60,00	0,96	2,88	0,26	3,00	0,27	0,09
Milch 43 2 01.#av	g	49	20,67	13,33	8,67	63,33	1,55	2,38	0,33	1,54	0,21	0,14
Milch 44 1 01.#av	g	29	8,67	10,67	4,00	38,00	0,81	2,17	0,23	2,67	0,28	0,11
Milch 44 2 01.#av	g	29	26,67	8,67	4,67	62,00	3,08	5,71	0,43	1,86	0,14	0,08
Milch 46 1 01.#av	g	14	17,33	4,67	2,00	32,00	3,71	8,67	0,54	2,33	0,15	0,06
Milch 46 2 01.#av	g	14	3,33	5,33	1,33	16,00	0,63	2,50	0,21	4,00	0,33	0,08
Milch 475 1 01.#a	k	2278	75,33	623,33	91,33	1026,67	0,12	0,82	0,07	6,82	0,61	0,09
Milch 475 2 01.#a	k	2278	66,00	734,67	68,00	1095,33	0,09	0,97	0,06	10,80	0,67	0,06
Milch 47 1 01.#av	g	30	24,00	17,33	3,33	75,33	1,38	7,20	0,32	5,20	0,23	0,04
Milch 47 2 01.#av	g	30	14,00	8,00	1,33	34,67	1,75	10,50	0,40	6,00	0,23	0,04
Milch 48 1 01.#av	g	57	13,33	18,67	6,00	57,33	0,71	2,22	0,23	3,11	0,33	0,10
Milch 48 2 01.#av	g	57	19,33	17,33	10,67	65,33	1,12	1,81	0,30	1,62	0,27	0,16
Milch 50 1 01.#av	g	26	30,67	12,00	7,33	81,33	2,56	4,18	0,38	1,64	0,15	0,09
Milch 50 2 01.#av	g	26	15,33	3,33	4,00	36,67	4,60	3,83	0,42	0,83	0,09	0,11
Milch 538 1 01.#a	k	2582	156,00	267,33	56,67	680,67	0,58	2,75	0,23	4,72	0,39	0,08
Milch 538 2 01.#a	k	2582	160,67	228,67	46,00	636,67	0,70	3,49	0,25	4,97	0,36	0,07
Milch 53 1 01.#av	g	18	22,67	7,33	6,00	53,33	3,09	3,78	0,43	1,22	0,14	0,11
Milch 53 2 01.#av	g	18	38,67	12,00	5,33	72,67	3,22	7,25	0,53	2,25	0,17	0,07
Milch 55 1 01.#av	g	23	20,00	18,00	4,00	67,33	1,11	5,00	0,30	4,50	0,27	0,06
Milch 55 2 01.#av	g	23	24,67	20,00	6,00	77,33	1,23	4,11	0,32	3,33	0,26	0,08
Milch 57 1 01.#av	g	16	16,00	10,00	4,67	49,33	1,60	3,43	0,32	2,14	0,20	0,09
Milch 57 2 01.#av	g	16	28,67	14,67	4,67	72,00	1,95	6,14	0,40	3,14	0,20	0,06
Milch 58 1 01.#av	g	24	16,00	10,67	4,00	50,00	1,50	4,00	0,32	2,67	0,21	0,08
Milch 58 2 01.#av	g	24	16,00	12,67	2,67	50,00	1,26	6,00	0,32	4,75	0,25	0,05
Milch 59 1 01.#av	s	225	13,33	64,67	12,67	134,67	0,21	1,05	0,10	5,11	0,48	0,09
Milch 59 2 01.#av	s	225	9,33	71,33	10,67	134,67	0,13	0,88	0,07	6,69	0,53	0,08
Milch 60 1 01.#av	s	569	38,67	52,67	18,67	168,00	0,73	2,07	0,23	2,82	0,31	0,11

<i>Milch 60 2 01.#av</i>	s	569	33,33	60,67	8,67	164,67	0,55	3,85	0,20	7,00	0,37	0,05
<i>Milch 668 1 01.#a</i>	s	1412	284,67	535,33	74,67	1309,33	0,53	3,81	0,22	7,17	0,41	0,06
<i>Milch 668 2 01.#a</i>	s	1412	218,00	412,67	71,33	1042,00	0,53	3,06	0,21	5,79	0,40	0,07

Status: identifizierter Gesundheitsstatus (g:gesund, s:subklinisch erkrankt, k: klinisch erkrankt)

SCC Foss: somatische Zellzahl mittels FossomaticTM 5000 bestimmt

Vorne, mitte, hinten: Lage des kritischen Bereichs der Zellgrößenverteilung

Q: Quotient

V: vorderer kritischer Bereich \triangleq vorne

M: mittlerer kritischer Bereich \triangleq mitte

H: hinterer kritischer Bereich \triangleq hinten

Anhang 4

Zu Kapitel 4.3.4:

Kennzahlen zur Krankheitserkennung mittels Coulter Counter von Tieren im Verlauf einer Mastitis

Probe	Melk.	SCC	vorne	mitte	hinten	gesamt	QVM	QVH	QVG	QMH	QMG	QHG
		Foss	Coulter Counter									
221_067_früh_a	1	1304	58,00	43,33	27,33	186,00	1,34	2,12	0,31	1,59	0,23	0,15
221_067_früh_b	1	1304	48,67	61,33	26,67	202,00	0,79	1,83	0,24	2,30	0,30	0,13
331_097_spät_a	1	608	40,00	149,33	36,00	321,33	0,27	1,11	0,12	4,15	0,46	0,11
331_097_spät_b	1	608	61,33	164,67	36,00	396,00	0,37	1,70	0,15	4,57	0,42	0,09
393_296_früh_a	1	206	36,00	30,67	6,67	119,33	1,17	5,40	0,30	4,60	0,26	0,06
393_296_früh_b	1	206	41,33	30,00	6,00	114,00	1,38	6,89	0,36	5,00	0,26	0,05
455_097_früh_a	1	2303	272,00	497,33	62,00	1364,67	0,55	4,39	0,20	8,02	0,36	0,05
455_097_früh_b	1	2303	244,00	439,33	69,33	1196,67	0,56	3,52	0,20	6,34	0,37	0,06
460_017_spät_a	1	136	330,00	130,67	32,67	715,33	2,53	10,10	0,46	4,00	0,18	0,05
460_017_spät_b	1	136	285,33	98,67	31,33	618,67	2,89	9,11	0,46	3,15	0,16	0,05
597_266_spät_a	1	2410	130,67	433,33	15,33	828,00	0,30	8,52	0,16	28,26	0,52	0,02
597_266_spät_b	1	2410	146,67	606,67	26,67	1102,67	0,24	5,50	0,13	22,75	0,55	0,02
655_167_früh_a	1	385	23,33	108,00	22,00	234,00	0,22	1,06	0,10	4,91	0,46	0,09
655_167_früh_b	1	385	20,67	98,00	30,67	238,67	0,21	0,67	0,09	3,20	0,41	0,13
718_276_früh_a	1	17361	226,67	1171,33	55,33	2000,67	0,19	4,10	0,11	21,17	0,59	0,03
718_276_früh_b	1	17361	215,33	1046,67	55,33	1828,00	0,21	3,89	0,12	18,92	0,57	0,03
723_126_früh_a	1	3820	84,67	398,67	54,67	792,67	0,21	1,55	0,11	7,29	0,50	0,07
723_126_früh_b	1	3820	67,33	331,33	36,00	658,67	0,20	1,87	0,10	9,20	0,50	0,05
762_027_früh_a	1	54	29,33	12,67	2,67	66,67	2,32	11,00	0,44	4,75	0,19	0,04
762_027_früh_b	1	54	19,33	16,67	8,00	65,33	1,16	2,42	0,30	2,08	0,26	0,12
393_296_spät_a	2	310	56,67	76,00	2,00	216,67	0,75	28,33	0,26	38,00	0,35	0,01
393_296_spät_b	2	310	76,00	68,67	8,00	240,00	1,11	9,50	0,32	8,58	0,29	0,03
455_097_spät_a	2	3598	490,67	682,00	100,67	2220,00	0,72	4,87	0,22	6,77	0,31	0,05
455_097_spät_b	2	3598	471,33	704,00	102,00	2188,67	0,67	4,62	0,22	6,90	0,32	0,05
460_027_früh_a	2	131	42,00	58,00	12,67	180,67	0,72	3,32	0,23	4,58	0,32	0,07
460_027_früh_b	2	131	29,33	38,67	11,33	138,67	0,76	2,59	0,21	3,41	0,28	0,08
597_276_früh_a	2	1497	133,33	85,33	13,33	341,33	1,56	10,00	0,39	6,40	0,25	0,04
597_276_früh_b	2	1497	228,00	92,67	16,00	482,00	2,46	14,25	0,47	5,79	0,19	0,03
655_167_spät_a	2	715	70,00	94,00	12,67	311,33	0,74	5,53	0,22	7,42	0,30	0,04
655_167_spät_b	2	715	66,67	109,33	19,33	360,00	0,61	3,45	0,19	5,66	0,30	0,05
718_276_spät_a	2	7264	138,67	301,33	12,00	668,67	0,46	11,56	0,21	25,11	0,45	0,02
718_276_spät_b	2	7264	148,67	297,33	13,33	712,00	0,50	11,15	0,21	22,30	0,42	0,02
723_126_spät_a	2	1774	38,67	104,00	68,00	372,67	0,37	0,57	0,10	1,53	0,28	0,18
723_126_spät_b	2	1774	60,00	129,33	79,33	489,33	0,46	0,76	0,12	1,63	0,26	0,16
762_027_spät_a	2	56	122,00	30,00	6,67	221,33	4,07	18,30	0,55	4,50	0,14	0,03
762_027_spät_b	2	56	44,00	14,00	4,67	94,00	3,14	9,43	0,47	3,00	0,15	0,05
221_077_früh_a	3	501	60,67	32,00	14,00	162,00	1,90	4,33	0,37	2,29	0,20	0,09
221_077_früh_b	3	501	58,00	37,33	10,67	154,67	1,55	5,44	0,38	3,50	0,24	0,07
331_107_spät_a	3	3737	26,00	1040,00	15,33	1400,00	0,03	1,70	0,02	67,83	0,74	0,01
331_107_spät_b	3	3737	37,33	1658,67	15,33	2147,33	0,02	2,43	0,02	108,17	0,77	0,01
393_306_früh_a	3	434	208,00	96,67	35,33	552,67	2,15	5,89	0,38	2,74	0,17	0,06
393_306_früh_b	3	434	195,33	81,33	24,67	508,00	2,40	7,92	0,38	3,30	0,16	0,05
455_107_spät_a	3	1088	56,00	216,67	16,00	440,00	0,26	3,50	0,13	13,54	0,49	0,04

455 107 spät b	3	1088	76,00	230,67	21,33	490,00	0,33	3,56	0,16	10,81	0,47	0,04
460 146 früh a	3	7547	122,67	1458,67	494,67	2718,67	0,08	0,25	0,05	2,95	0,54	0,18
460 146 früh b	3	7547	118,00	1512,00	494,00	2813,33	0,08	0,24	0,04	3,06	0,54	0,18
597 276 spät a	3	2057	179,33	236,67	40,67	648,67	0,76	4,41	0,28	5,82	0,36	0,06
597 276 spät b	3	2057	188,00	278,00	57,33	765,33	0,68	3,28	0,25	4,85	0,36	0,07
655 177 früh a	3	465	50,00	42,67	5,33	194,67	1,17	9,38	0,26	8,00	0,22	0,03
655 177 früh b	3	465	42,67	45,33	5,33	178,67	0,94	8,00	0,24	8,50	0,25	0,03
718 286 früh a	3	1409	260,67	136,00	25,33	629,33	1,92	10,29	0,41	5,37	0,22	0,04
718 286 früh b	3	1409	175,33	78,67	14,67	382,67	2,23	11,95	0,46	5,36	0,21	0,04
723 136 früh a	3	3191	110,67	136,00	24,67	546,67	0,81	4,49	0,20	5,51	0,25	0,05
723 136 früh b	3	3191	126,67	147,33	28,00	592,67	0,86	4,52	0,21	5,26	0,25	0,05
762 286 früh a	3	135	68,67	34,00	10,67	155,33	2,02	6,44	0,44	3,19	0,22	0,07
762 286 früh b	3	135	108,67	43,33	6,67	208,00	2,51	16,30	0,52	6,50	0,21	0,03
221 077 spät a	4	427	48,67	36,67	16,00	153,33	1,33	3,04	0,32	2,29	0,24	0,10
221 077 spät b	4	427	35,33	36,00	8,00	124,67	0,98	4,42	0,28	4,50	0,29	0,06
393 306 spät a	4	323	140,67	104,00	10,67	401,33	1,35	13,19	0,35	9,75	0,26	0,03
393 306 spät b	4	323	115,33	95,33	11,33	370,67	1,21	10,18	0,31	8,41	0,26	0,03
460 146 spät a	4	10453	356,67	2037,33	826,67	4636,00	0,18	0,43	0,08	2,46	0,44	0,18
460 146 spät b	4	10453	372,67	2126,67	832,00	4707,33	0,18	0,45	0,08	2,56	0,45	0,18
565 137 spät a	4	479	31,33	144,00	20,00	272,00	0,22	1,57	0,12	7,20	0,53	0,07
565 137 spät b	4	479	25,33	153,33	24,67	292,00	0,17	1,03	0,09	6,22	0,53	0,08
597 286 früh a	4	1503	86,00	68,00	10,00	258,00	1,26	8,60	0,33	6,80	0,26	0,04
597 286 früh b	4	1503	70,00	58,00	10,67	234,00	1,21	6,56	0,30	5,44	0,25	0,05
655 177 spät a	4	590	98,67	82,67	14,67	353,33	1,19	6,73	0,28	5,64	0,23	0,04
655 177 spät b	4	590	94,00	76,67	10,00	324,67	1,23	9,40	0,29	7,67	0,24	0,03
718 286 spät a	4	3618	72,67	140,00	22,67	321,33	0,52	3,21	0,23	6,18	0,44	0,07
718 286 spät b	4	3618	86,67	108,67	20,67	316,00	0,80	4,19	0,27	5,26	0,34	0,07
723 136 spät a	4	2264	188,67	239,33	80,67	926,67	0,79	2,34	0,20	2,97	0,26	0,09
723 136 spät b	4	2264	208,67	293,33	107,33	1096,00	0,71	1,94	0,19	2,73	0,27	0,10
762 286 spät a	4	1441	75,33	306,67	58,00	595,33	0,25	1,30	0,13	5,29	0,52	0,10
762 286 spät b	4	1441	80,67	294,67	71,33	624,67	0,27	1,13	0,13	4,13	0,47	0,11
221 087 früh a	5	368	46,00	46,67	14,00	165,33	0,99	3,29	0,28	3,33	0,28	0,08
221 087 früh b	5	368	52,00	41,33	10,00	148,67	1,26	5,20	0,35	4,13	0,28	0,07
393 017 früh a	5	151	116,00	26,67	5,33	215,33	4,35	21,75	0,54	5,00	0,12	0,02
393 017 früh b	5	151	144,00	26,67	5,33	238,00	5,40	27,00	0,61	5,00	0,11	0,02
455 137 spät a	5	430	96,67	181,33	15,33	462,00	0,53	6,30	0,21	11,83	0,39	0,03
455 137 spät b	5	430	97,33	222,67	22,67	584,67	0,44	4,29	0,17	9,82	0,38	0,04
460 156 früh a	5	3576	120,67	386,00	90,00	897,33	0,31	1,34	0,13	4,29	0,43	0,10
460 156 früh b	5	3576	148,00	430,00	88,00	974,67	0,34	1,68	0,15	4,89	0,44	0,09
565 147 spät a	5	625	32,67	150,67	86,00	404,67	0,22	0,38	0,08	1,75	0,37	0,21
565 147 spät b	5	625	37,33	108,67	70,00	324,67	0,34	0,53	0,11	1,55	0,33	0,22
597 286 spät a	5	3880	228,00	181,33	20,67	781,33	1,26	11,03	0,29	8,77	0,23	0,03
597 286 spät b	5	3880	187,33	194,00	33,33	738,00	0,97	5,62	0,25	5,82	0,26	0,05
655 187 früh a	5	504	92,67	51,33	6,00	266,67	1,81	15,44	0,35	8,56	0,19	0,02
655 187 früh b	5	504	113,33	58,00	3,33	292,00	1,95	34,00	0,39	17,40	0,20	0,01
718 296 früh a	5	1223	12,67	39,33	4,67	88,67	0,32	2,71	0,14	8,43	0,44	0,05
718 296 früh b	5	1223	26,00	36,67	4,67	98,00	0,71	5,57	0,27	7,86	0,37	0,05
723 146 früh a	5	1388	134,00	194,00	64,67	676,00	0,69	2,07	0,20	3,00	0,29	0,10
723 146 früh b	5	1388	116,67	139,33	53,33	558,67	0,84	2,19	0,21	2,61	0,25	0,10
762 296 früh a	5	138	27,33	36,00	8,00	102,67	0,76	3,42	0,27	4,50	0,35	0,08
762 296 früh b	5	138	27,33	29,33	3,33	88,67	0,93	8,20	0,31	8,80	0,33	0,04
221 087 spät a	6	455	85,33	72,67	18,00	258,67	1,17	4,74	0,33	4,04	0,28	0,07
221 087 spät b	6	455	64,00	54,00	14,67	210,67	1,19	4,36	0,30	3,68	0,26	0,07

393 017 spät a	6	85	48,67	25,33	5,33	130,67	1,92	9,13	0,37	4,75	0,19	0,04
393 017 spät b	6	85	48,67	36,00	2,00	141,33	1,35	24,33	0,34	18,00	0,25	0,01
460 156 spät a	6	2588	84,67	336,00	68,67	732,00	0,25	1,23	0,12	4,89	0,46	0,09
460 156 spät b	6	2588	92,00	379,33	102,00	821,33	0,24	0,90	0,11	3,72	0,46	0,12
565 157 spät a	6	480	15,33	68,00	39,33	189,33	0,23	0,39	0,08	1,73	0,36	0,21
565 157 spät b	6	480	15,33	80,00	36,67	205,33	0,19	0,42	0,07	2,18	0,39	0,18
597 296 früh a	6	1947	92,00	123,33	8,67	398,67	0,75	10,62	0,23	14,23	0,31	0,02
597 296 früh b	6	1947	98,00	159,33	10,67	468,67	0,62	9,19	0,21	14,94	0,34	0,02
718 296 spät a	6	3755	86,67	263,33	24,67	557,33	0,33	3,51	0,16	10,68	0,47	0,04
718 296 spät b	6	3755	108,00	252,00	36,00	602,67	0,43	3,00	0,18	7,00	0,42	0,06
723 146 spät a	6	1182	219,33	290,67	40,00	911,33	0,75	5,48	0,24	7,27	0,32	0,04
723 146 spät b	6	1182	233,33	271,33	36,67	888,00	0,86	6,36	0,26	7,40	0,31	0,04
762 296 spät a	6	193	24,00	30,00	12,00	101,33	0,80	2,00	0,24	2,50	0,30	0,12
762 296 spät b	6	193	46,00	29,33	5,33	118,67	1,57	8,62	0,39	5,50	0,25	0,04
221 097 früh a	7	132	31,33	36,00	16,00	118,00	0,87	1,96	0,27	2,25	0,31	0,14
221 097 früh b	7	132	34,00	38,67	10,00	118,00	0,88	3,40	0,29	3,87	0,33	0,08
331 137 spät a	7	721	120,00	124,67	23,33	458,67	0,96	5,14	0,26	5,34	0,27	0,05
331 137 spät b	7	721	112,00	103,33	20,00	434,67	1,08	5,60	0,26	5,17	0,24	0,05
393 027 früh a	7	48	2017,34	304,00	50,67	3199,33	6,64	39,82	0,63	6,00	0,10	0,02
393 027 früh b	7	48	25,33	22,67	1,33	75,33	1,12	19,00	0,34	17,00	0,30	0,02
460 166 früh a	7	2448	121,33	740,00	111,33	1344,00	0,16	1,09	0,09	6,65	0,55	0,08
460 166 früh b	7	2448	101,33	658,67	102,00	1193,33	0,15	0,99	0,08	6,46	0,55	0,09
565 167 früh a	7	247	6,00	32,00	19,33	86,00	0,19	0,31	0,07	1,66	0,37	0,22
565 167 früh b	7	247	4,67	24,67	22,67	86,67	0,19	0,21	0,05	1,09	0,28	0,26
597 017 früh a	7	1734	595,33	290,67	74,00	1436,67	2,05	8,05	0,41	3,93	0,20	0,05
597 017 früh b	7	1734	230,00	211,33	46,67	746,67	1,09	4,93	0,31	4,53	0,28	0,06
597 296 spät a	7	2567	260,00	468,00	19,33	1281,33	0,56	13,45	0,20	24,21	0,37	0,02
597 296 spät b	7	2567	236,00	467,33	21,33	1185,33	0,50	11,06	0,20	21,91	0,39	0,02
718 306 früh a	7	2682	82,00	188,00	19,33	452,00	0,44	4,24	0,18	9,72	0,42	0,04
718 306 früh b	7	2682	126,00	242,67	26,00	621,33	0,52	4,85	0,20	9,33	0,39	0,04
723 156 früh a	7	732	84,00	94,00	15,33	343,33	0,89	5,48	0,24	6,13	0,27	0,04
723 156 früh b	7	732	67,33	88,67	13,33	314,67	0,76	5,05	0,21	6,65	0,28	0,04
762 306 früh a	7	61	21,33	24,00	4,00	72,67	0,89	5,33	0,29	6,00	0,33	0,06
762 306 früh b	7	61	102,00	31,33	4,67	190,67	3,26	21,86	0,53	6,71	0,16	0,02
221 097 spät a	8	164	68,00	48,67	16,67	198,67	1,40	4,08	0,34	2,92	0,24	0,08
221 097 spät b	8	164	49,33	61,33	13,33	191,33	0,80	3,70	0,26	4,60	0,32	0,07
393 027 spät a	8	65	21,33	18,00	2,67	67,33	1,19	8,00	0,32	6,75	0,27	0,04
393 027 spät b	8	65	18,67	16,00	4,00	64,67	1,17	4,67	0,29	4,00	0,25	0,06
460 166 spät a	8	3424	144,00	694,00	68,67	1234,67	0,21	2,10	0,12	10,11	0,56	0,06
460 166 spät b	8	3424	127,33	733,33	70,00	1291,33	0,17	1,82	0,10	10,48	0,57	0,05
565 167 spät a	8	256	10,00	36,00	22,00	104,00	0,28	0,45	0,10	1,64	0,35	0,21
565 167 spät b	8	256	7,33	38,67	20,67	104,67	0,19	0,35	0,07	1,87	0,37	0,20
597 017 spät a	8	2089	122,00	146,67	24,00	464,00	0,83	5,08	0,26	6,11	0,32	0,05
597 017 spät b	8	2089	130,00	184,67	33,33	554,67	0,70	3,90	0,23	5,54	0,33	0,06
597 306 früh a	8	1901	168,67	129,33	20,67	432,67	1,30	8,16	0,39	6,26	0,30	0,05
597 306 früh b	8	1901	91,33	137,33	20,00	348,67	0,67	4,57	0,26	6,87	0,39	0,06
655 187 spät a	8	505	67,33	48,00	4,67	211,33	1,40	14,43	0,32	10,29	0,23	0,02
655 187 spät b	8	505	95,33	32,67	5,33	228,00	2,92	17,88	0,42	6,13	0,14	0,02
718 306 spät a	8	3386	199,33	338,00	16,67	936,67	0,59	11,96	0,21	20,28	0,36	0,02
718 306 spät b	8	3386	119,33	230,00	18,67	571,33	0,52	6,39	0,21	12,32	0,40	0,03
723 156 spät a	8	582	135,33	207,33	15,33	574,67	0,65	8,83	0,24	13,52	0,36	0,03
723 156 spät b	8	582	107,33	196,00	18,67	527,33	0,55	5,75	0,20	10,50	0,37	0,04
762 306 spät a	8	132	32,67	18,00	4,00	88,00	1,81	8,17	0,37	4,50	0,20	0,05

762 306 spät b	8	132	30,67	23,33	7,33	94,67	1,31	4,18	0,32	3,18	0,25	0,08
331 147 spät a	9	694	104,00	75,33	23,33	371,33	1,38	4,46	0,28	3,23	0,20	0,06
331 147 spät b	9	694	118,00	71,33	30,00	412,67	1,65	3,93	0,29	2,38	0,17	0,07
393 037 früh a	9	23	11,33	9,33	1,33	34,67	1,21	8,50	0,33	7,00	0,27	0,04
393 037 früh b	9	23	8,67	2,67	2,00	24,00	3,25	4,33	0,36	1,33	0,11	0,08
455 147 spät a	9	209	43,33	53,33	15,33	196,00	0,81	2,83	0,22	3,48	0,27	0,08
455 147 spät b	9	209	41,33	50,67	9,33	164,67	0,82	4,43	0,25	5,43	0,31	0,06
460 176 früh a	9	4204	160,67	1040,67	94,00	1766,00	0,15	1,71	0,09	11,07	0,59	0,05
460 176 früh b	9	4204	160,67	930,67	120,00	1620,00	0,17	1,34	0,10	7,76	0,57	0,07
565 177 früh a	9	163	9,33	9,33	16,00	62,00	1,00	0,58	0,15	0,58	0,15	0,26
565 177 früh b	9	163	2,00	15,33	16,67	54,00	0,13	0,12	0,04	0,92	0,28	0,31
597 306 spät a	9	3899	182,00	556,00	72,00	1263,33	0,33	2,53	0,14	7,72	0,44	0,06
597 306 spät b	9	3899	210,00	564,67	60,67	1255,33	0,37	3,46	0,17	9,31	0,45	0,05
655 197 früh a	9	322	84,00	36,67	5,33	206,67	2,29	15,75	0,41	6,88	0,18	0,03
655 197 früh b	9	322	92,67	41,33	4,67	230,67	2,24	19,86	0,40	8,86	0,18	0,02
718 017 früh a	9	3588	189,33	505,33	51,33	1136,00	0,37	3,69	0,17	9,84	0,44	0,05
718 017 früh b	9	3588	126,00	336,00	34,00	778,00	0,37	3,71	0,16	9,88	0,43	0,04
723 166 früh a	9	427	80,00	144,00	17,33	388,00	0,56	4,62	0,21	8,31	0,37	0,04
723 166 früh b	9	427	76,00	103,33	8,67	319,33	0,74	8,77	0,24	11,92	0,32	0,03
763 196 spät a	9	7241	574,67	4324,00	231,33	7023,34	0,13	2,48	0,08	18,69	0,62	0,03
763 196 spät b	9	7241	535,33	4359,33	284,67	7055,33	0,12	1,88	0,08	15,31	0,62	0,04
221 107 spät a	10	79	20,67	6,67	9,33	58,00	3,10	2,21	0,36	0,71	0,11	0,16
221 107 spät b	10	79	18,67	17,33	13,33	78,67	1,08	1,40	0,24	1,30	0,22	0,17
460 176 spät a	10	3051	76,67	883,33	32,67	1294,00	0,09	2,35	0,06	27,04	0,68	0,03
460 176 spät b	10	3051	80,00	905,33	35,33	1335,33	0,09	2,26	0,06	25,62	0,68	0,03
596 017 spät a	10	214	88,00	126,00	21,33	343,33	0,70	4,13	0,26	5,91	0,37	0,06
596 017 spät b	10	214	77,33	84,67	12,00	264,67	0,91	6,44	0,29	7,06	0,32	0,05
597 027 früh a	10	710	30,00	28,00	5,33	105,33	1,07	5,63	0,28	5,25	0,27	0,05
597 027 früh b	10	710	32,00	30,67	9,33	114,00	1,04	3,43	0,28	3,29	0,27	0,08
653 167 spät a	10	10339	140,00	643,33	87,33	1162,67	0,22	1,60	0,12	7,37	0,55	0,08
653 167 spät b	10	10339	78,67	450,00	74,00	791,33	0,17	1,06	0,10	6,08	0,57	0,09
718 017 spät a	10	2738	94,00	247,33	24,00	584,00	0,38	3,92	0,16	10,31	0,42	0,04
718 017 spät b	10	2738	116,67	291,33	27,33	658,00	0,40	4,27	0,18	10,66	0,44	0,04
723 166 spät a	10	448	64,67	92,67	6,67	274,00	0,70	9,70	0,24	13,90	0,34	0,02
723 166 spät b	10	448	82,67	109,33	11,33	321,33	0,76	7,29	0,26	9,65	0,34	0,04
763 206 früh a	10	1620	332,67	349,33	50,00	1237,33	0,95	6,65	0,27	6,99	0,28	0,04
763 206 früh b	10	1620	314,67	400,67	51,33	1266,00	0,79	6,13	0,25	7,81	0,32	0,04
331 157 spät a	11	262	87,33	47,33	12,67	238,00	1,85	6,89	0,37	3,74	0,20	0,05
331 157 spät b	11	262	120,67	52,00	14,00	295,33	2,32	8,62	0,41	3,71	0,18	0,05
393 047 früh a	11	57	20,00	12,00	5,33	60,67	1,67	3,75	0,33	2,25	0,20	0,09
393 047 früh b	11	57	8,67	10,67	4,67	36,67	0,81	1,86	0,24	2,29	0,29	0,13
455 157 spät a	11	177	32,00	46,00	2,67	169,33	0,70	12,00	0,19	17,25	0,27	0,02
455 157 spät b	11	177	45,33	52,67	6,00	178,67	0,86	7,56	0,25	8,78	0,29	0,03
460 186 früh a	11	2287	47,33	508,67	34,00	811,33	0,09	1,39	0,06	14,96	0,63	0,04
460 186 früh b	11	2287	51,33	600,67	34,67	954,00	0,09	1,48	0,05	17,33	0,63	0,04
596 027 früh a	11	99	27,33	45,33	7,33	120,00	0,60	3,73	0,23	6,18	0,38	0,06
596 027 früh b	11	99	39,33	28,67	8,67	111,33	1,37	4,54	0,35	3,31	0,26	0,08
597 027 spät a	11	1002	330,00	122,67	22,67	668,67	2,69	14,56	0,49	5,41	0,18	0,03
597 027 spät b	11	1002	26,67	39,33	8,67	140,67	0,68	3,08	0,19	4,54	0,28	0,06
653 177 früh a	11	4244	15,33	21,33	3,33	61,33	0,72	4,60	0,25	6,40	0,35	0,05
653 177 früh b	11	4244	22,67	52,00	6,67	130,00	0,44	3,40	0,17	7,80	0,40	0,05
655 197 spät a	11	894	126,67	234,00	63,33	642,67	0,54	2,00	0,20	3,69	0,36	0,10
655 197 spät b	11	894	112,00	230,67	59,33	606,67	0,49	1,89	0,18	3,89	0,38	0,10

718 027 früh a	11	1672	61,33	94,67	14,67	284,00	0,65	4,18	0,22	6,45	0,33	0,05
718 027 früh b	11	1672	88,00	102,67	10,00	335,33	0,86	8,80	0,26	10,27	0,31	0,03
723 176 früh a	11	288	62,67	62,00	8,67	214,67	1,01	7,23	0,29	7,15	0,29	0,04
723 176 früh b	11	288	50,00	54,67	13,33	216,67	0,91	3,75	0,23	4,10	0,25	0,06
763 206 spät a	11	1982	346,67	354,67	47,33	1280,67	0,98	7,32	0,27	7,49	0,28	0,04
763 206 spät b	11	1982	369,33	399,33	68,67	1431,33	0,92	5,38	0,26	5,82	0,28	0,05
331 167 früh a	12	188	21,33	11,33	10,67	78,67	1,88	2,00	0,27	1,06	0,14	0,14
331 167 früh b	12	188	20,67	15,33	6,00	71,33	1,35	3,44	0,29	2,56	0,21	0,08
393 047 spät a	12	93	45,33	14,67	4,67	91,33	3,09	9,71	0,50	3,14	0,16	0,05
393 047 spät b	12	93	22,67	16,67	6,00	72,00	1,36	3,78	0,31	2,78	0,23	0,08
460 186 spät a	12	1519	27,33	235,33	32,00	442,67	0,12	0,85	0,06	7,35	0,53	0,07
460 186 spät b	12	1519	30,67	232,67	29,33	399,33	0,13	1,05	0,08	7,93	0,58	0,07
596 027 spät a	12	260	50,67	71,33	25,33	222,00	0,71	2,00	0,23	2,82	0,32	0,11
596 027 spät b	12	260	66,67	92,67	22,67	274,67	0,72	2,94	0,24	4,09	0,34	0,08
597 037 früh a	12	447	24,67	14,67	8,67	94,67	1,68	2,85	0,26	1,69	0,15	0,09
597 037 früh b	12	447	19,33	12,00	6,67	83,33	1,61	2,90	0,23	1,80	0,14	0,08
653 177 spät a	12	7011	167,33	297,33	56,67	728,00	0,56	2,95	0,23	5,25	0,41	0,08
653 177 spät b	12	7011	186,00	306,67	63,33	784,67	0,61	2,94	0,24	4,84	0,39	0,08
655 207 früh a	12	1106	80,00	188,00	27,33	411,33	0,43	2,93	0,19	6,88	0,46	0,07
655 207 früh b	12	1106	80,67	217,33	44,67	481,33	0,37	1,81	0,17	4,87	0,45	0,09
718 027 spät a	12	2808	190,00	291,33	37,33	878,00	0,65	5,09	0,22	7,80	0,33	0,04
718 027 spät b	12	2808	118,00	174,00	24,00	536,00	0,68	4,92	0,22	7,25	0,32	0,04
721 017 früh a	12	2623	196,67	530,00	106,67	1342,00	0,37	1,84	0,15	4,97	0,39	0,08
721 017 früh b	12	2623	196,67	462,00	90,00	1272,00	0,43	2,19	0,15	5,13	0,36	0,07
723 176 spät a	12	227	27,33	55,33	7,33	146,00	0,49	3,73	0,19	7,55	0,38	0,05
723 176 spät b	12	227	25,33	49,33	2,00	137,33	0,51	12,67	0,18	24,67	0,36	0,01
763 216 früh a	12	1758	246,00	210,00	42,00	863,33	1,17	5,86	0,28	5,00	0,24	0,05
763 216 früh b	12	1758	247,33	232,00	36,00	986,00	1,07	6,87	0,25	6,44	0,24	0,04
331 167 spät a	13	337	124,00	92,00	22,00	386,00	1,35	5,64	0,32	4,18	0,24	0,06
331 167 spät b	13	337	110,00	51,33	20,67	316,00	2,14	5,32	0,35	2,48	0,16	0,07
393 057 früh a	13	53	8,00	28,67	5,33	52,00	0,28	1,50	0,15	5,37	0,55	0,10
393 057 früh b	13	53	7,33	18,67	7,33	46,67	0,39	1,00	0,16	2,55	0,40	0,16
455 167 früh a	13	74	58,00	16,67	0,67	98,00	3,48	87,00	0,59	25,00	0,17	0,01
455 167 früh b	13	74	10,67	19,33	2,67	50,00	0,55	4,00	0,21	7,25	0,39	0,05
460 196 früh a	13	6741	360,00	2959,34	167,33	4398,67	0,12	2,15	0,08	17,69	0,67	0,04
460 196 früh b	13	6741	328,00	3068,67	149,33	4442,00	0,11	2,20	0,07	20,55	0,69	0,03
596 037 früh a	13	121	42,00	29,33	12,00	139,33	1,43	3,50	0,30	2,44	0,21	0,09
596 037 früh b	13	121	265,33	44,67	11,33	410,00	5,94	23,41	0,65	3,94	0,11	0,03
597 047 früh a	13	287	14,67	12,00	3,33	55,33	1,22	4,40	0,27	3,60	0,22	0,06
597 047 früh b	13	287	14,67	17,33	4,00	68,67	0,85	3,67	0,21	4,33	0,25	0,06
653 187 früh a	13	10426	418,67	854,67	300,00	2216,67	0,49	1,40	0,19	2,85	0,39	0,14
653 187 früh b	13	10426	467,33	844,67	285,33	2282,00	0,55	1,64	0,20	2,96	0,37	0,13
718 037 früh a	13	1395	40,67	78,67	14,00	246,00	0,52	2,90	0,17	5,62	0,32	0,06
718 037 früh b	13	1395	40,00	75,33	19,33	272,00	0,53	2,07	0,15	3,90	0,28	0,07
721 017 spät a	13	997	740,00	330,67	24,00	1516,67	2,24	30,83	0,49	13,78	0,22	0,02
721 017 spät b	13	997	196,67	291,33	12,00	773,33	0,68	16,39	0,25	24,28	0,38	0,02
723 186 früh a	13	124	24,67	22,00	4,00	84,67	1,12	6,17	0,29	5,50	0,26	0,05
723 186 früh b	13	124	19,33	26,67	4,67	80,67	0,72	4,14	0,24	5,71	0,33	0,06
763 216 spät a	13	2678	420,67	395,33	59,33	1602,67	1,06	7,09	0,26	6,66	0,25	0,04
763 216 spät b	13	2678	483,33	450,00	60,67	1758,00	1,07	7,97	0,27	7,42	0,26	0,03
331 177 früh a	14	199	63,33	48,00	13,33	196,67	1,32	4,75	0,32	3,60	0,24	0,07
331 177 früh b	14	199	54,00	50,00	12,00	192,00	1,08	4,50	0,28	4,17	0,26	0,06
393 057 spät a	14	637	10,00	145,33	65,33	320,67	0,07	0,15	0,03	2,22	0,45	0,20

393 057 spät b	14	637	7,33	149,33	63,33	304,00	0,05	0,12	0,02	2,36	0,49	0,21
455 167 spät a	14	109	18,00	31,33	3,33	86,00	0,57	5,40	0,21	9,40	0,36	0,04
455 167 spät b	14	109	16,67	24,67	3,33	68,67	0,68	5,00	0,24	7,40	0,36	0,05
460 196 spät a	14	1246	42,67	472,67	17,33	700,67	0,09	2,46	0,06	27,27	0,67	0,02
460 196 spät b	14	1246	54,67	520,67	25,33	796,67	0,10	2,16	0,07	20,55	0,65	0,03
653 187 spät a	14	15620	235,33	638,00	204,67	1617,33	0,37	1,15	0,15	3,12	0,39	0,13
653 187 spät b	14	15620	258,00	651,33	186,67	1620,67	0,40	1,38	0,16	3,49	0,40	0,12
718 037 spät a	14	1328	74,00	207,33	26,00	459,33	0,36	2,85	0,16	7,97	0,45	0,06
718 037 spät b	14	1328	91,33	293,33	36,00	640,67	0,31	2,54	0,14	8,15	0,46	0,06
721 027 früh a	14	717	84,67	289,33	21,33	604,00	0,29	3,97	0,14	13,56	0,48	0,04
721 027 früh b	14	717	122,00	270,67	19,33	656,67	0,45	6,31	0,19	14,00	0,41	0,03
763 226 früh a	14	746	178,00	126,67	14,67	554,00	1,41	12,14	0,32	8,64	0,23	0,03
763 226 früh b	14	746	158,00	128,67	18,67	524,67	1,23	8,46	0,30	6,89	0,25	0,04
331 177 spät a	15	263	81,33	50,00	15,33	229,33	1,63	5,30	0,35	3,26	0,22	0,07
331 177 spät b	15	263	80,00	69,33	16,00	256,67	1,15	5,00	0,31	4,33	0,27	0,06
393 067 früh a	15	794	14,00	185,33	41,33	308,67	0,08	0,34	0,05	4,48	0,60	0,13
393 067 früh b	15	794	32,00	285,33	52,00	465,33	0,11	0,62	0,07	5,49	0,61	0,11
455 177 früh a	15	3723	32,00	1744,67	104,00	2134,67	0,02	0,31	0,01	16,78	0,82	0,05
455 177 früh b	15	3723	39,33	1815,33	88,00	2197,33	0,02	0,45	0,02	20,63	0,83	0,04
460 206 früh a	15	600	30,67	263,33	13,33	407,33	0,12	2,30	0,08	19,75	0,65	0,03
460 206 früh b	15	600	23,33	232,67	7,33	366,67	0,10	3,18	0,06	31,73	0,63	0,02
596 047 früh a	15	69	5,33	12,00	3,33	36,67	0,44	1,60	0,15	3,60	0,33	0,09
596 047 früh b	15	69	18,00	17,33	1,33	52,67	1,04	13,50	0,34	13,00	0,33	0,03
597 047 spät a	15	323	32,67	15,33	4,67	108,67	2,13	7,00	0,30	3,29	0,14	0,04
597 047 spät b	15	323	31,33	17,33	2,67	96,00	1,81	11,75	0,33	6,50	0,18	0,03
653 207 früh a	15	20097	234,67	1374,00	240,00	2429,33	0,17	0,98	0,10	5,73	0,57	0,10
653 207 früh b	15	20097	330,67	1511,33	241,33	2713,33	0,22	1,37	0,12	6,26	0,56	0,09
718 047 früh a	15	1712	56,67	274,00	20,00	569,33	0,21	2,83	0,10	13,70	0,48	0,04
718 047 früh b	15	1712	65,33	331,33	24,00	670,67	0,20	2,72	0,10	13,81	0,49	0,04
721 027 spät a	15	1604	251,33	587,33	34,00	1348,67	0,43	7,39	0,19	17,27	0,44	0,03
721 027 spät b	15	1604	280,67	615,33	36,00	1482,67	0,46	7,80	0,19	17,09	0,42	0,02
762 017 früh a	15	73	14,67	11,33	4,00	47,33	1,29	3,67	0,31	2,83	0,24	0,08
762 017 früh b	15	73	20,67	12,67	7,33	65,33	1,63	2,82	0,32	1,73	0,19	0,11
331 187 früh a	16	185	32,00	36,67	14,00	121,33	0,87	2,29	0,26	2,62	0,30	0,12
331 187 früh b	16	185	48,67	30,67	10,00	146,00	1,59	4,87	0,33	3,07	0,21	0,07
455 177 spät a	16	1626	103,33	872,67	40,67	1391,33	0,12	2,54	0,07	21,46	0,63	0,03
455 177 spät b	16	1626	103,33	864,67	35,33	1389,33	0,12	2,92	0,07	24,47	0,62	0,03
460 206 spät a	16	625	30,00	242,67	6,67	398,67	0,12	4,50	0,08	36,40	0,61	0,02
460 206 spät b	16	625	36,67	294,00	14,00	463,33	0,12	2,62	0,08	21,00	0,63	0,03
596 047 spät a	16	128	20,00	30,00	7,33	86,00	0,67	2,73	0,23	4,09	0,35	0,09
596 047 spät b	16	128	12,00	20,00	6,67	67,33	0,60	1,80	0,18	3,00	0,30	0,10
597 266 früh a	16	14377	446,67	3100,00	177,33	5180,00	0,14	2,52	0,09	17,48	0,60	0,03
597 266 früh b	16	14377	460,67	3685,33	192,00	5896,00	0,13	2,40	0,08	19,19	0,63	0,03
721 037 früh a	16	645	78,67	108,67	25,33	354,00	0,72	3,11	0,22	4,29	0,31	0,07
721 037 früh b	16	645	66,67	96,00	28,67	322,00	0,69	2,33	0,21	3,35	0,30	0,09
393 077 früh a	17	251	49,33	99,33	9,33	230,67	0,50	5,29	0,21	10,64	0,43	0,04
393 077 früh b	17	251	36,00	95,33	7,33	215,33	0,38	4,91	0,17	13,00	0,44	0,03
455 187 früh a	17	501	62,67	186,00	16,67	406,00	0,34	3,76	0,15	11,16	0,46	0,04
455 187 früh b	17	501	60,00	186,67	14,67	396,00	0,32	4,09	0,15	12,73	0,47	0,04
460 216 früh a	17	640	24,00	291,33	12,67	434,00	0,08	1,89	0,06	23,00	0,67	0,03
460 216 früh b	17	640	25,33	277,33	10,00	401,33	0,09	2,53	0,06	27,73	0,69	0,02
655 147 spät a	17	2235	91,33	684,00	268,67	1508,00	0,13	0,34	0,06	2,55	0,45	0,18
655 147 spät b	17	2235	80,67	648,67	297,33	1477,33	0,12	0,27	0,05	2,18	0,44	0,20

762 017 spät a	17	80	72,00	28,67	10,67	162,00	2,51	6,75	0,44	2,69	0,18	0,07
762 017 spät b	17	80	84,00	43,33	10,00	200,00	1,94	8,40	0,42	4,33	0,22	0,05
455 087 spät a	18	2574	258,67	707,33	140,67	1658,67	0,37	1,84	0,16	5,03	0,43	0,08
455 087 spät b	18	2574	250,00	673,33	145,33	1649,33	0,37	1,72	0,15	4,63	0,41	0,09
455 187 spät a	18	491	108,67	164,00	16,00	460,00	0,66	6,79	0,24	10,25	0,36	0,03
455 187 spät b	18	491	113,33	150,67	20,67	439,33	0,75	5,48	0,26	7,29	0,34	0,05
655 157 spät a	18	1089	78,67	489,33	67,33	909,33	0,16	1,17	0,09	7,27	0,54	0,07
655 157 spät b	18	1089	97,33	490,00	57,33	931,33	0,20	1,70	0,10	8,55	0,53	0,06
721 067 früh a	18	1048	83,33	200,67	48,00	568,67	0,42	1,74	0,15	4,18	0,35	0,08
721 067 früh b	18	1048	114,67	184,67	52,67	568,00	0,62	2,18	0,20	3,51	0,33	0,09
455 197 früh a	19	404	172,67	82,67	18,00	477,33	2,09	9,59	0,36	4,59	0,17	0,04
455 197 früh b	19	404	140,67	74,67	20,67	414,00	1,88	6,81	0,34	3,61	0,18	0,05
718 067 früh a	19	848	53,33	186,67	18,00	427,33	0,29	2,96	0,12	10,37	0,44	0,04
718 067 früh b	19	848	31,33	153,33	20,67	313,33	0,20	1,52	0,10	7,42	0,49	0,07
721 077 früh a	19	1313	250,00	351,33	26,67	1087,33	0,71	9,37	0,23	13,17	0,32	0,02
721 077 früh b	19	1313	133,33	748,67	32,00	1197,33	0,18	4,17	0,11	23,40	0,63	0,03
460 017 früh a	20	100	4,00	20,00	6,00	42,67	0,20	0,67	0,09	3,33	0,47	0,14
460 017 früh b	20	100	15,33	24,67	10,67	64,67	0,62	1,44	0,24	2,31	0,38	0,16
721 276 früh a	20	1116	210,00	393,33	15,33	1026,00	0,53	13,70	0,20	25,65	0,38	0,01
721 276 früh b	20	1116	162,00	460,00	7,33	934,00	0,35	22,09	0,17	62,73	0,49	0,01
718 077 früh a	21	516	41,33	130,67	9,33	306,00	0,32	4,43	0,14	14,00	0,43	0,03
718 077 früh b	21	516	37,33	152,67	9,33	309,33	0,24	4,00	0,12	16,36	0,49	0,03
721 276 spät a	21	1299	196,00	464,67	14,00	1056,00	0,42	14,00	0,19	33,19	0,44	0,01
721 276 spät b	21	1299	165,33	363,33	9,33	834,67	0,46	17,71	0,20	38,93	0,44	0,01
460 216 spät a	22	766	42,67	323,33	13,33	518,00	0,13	3,20	0,08	24,25	0,62	0,03
460 216 spät b	22	766	42,67	358,00	9,33	564,67	0,12	4,57	0,08	38,36	0,63	0,02
718 077 spät a	22	252	14,00	40,00	4,00	86,00	0,35	3,50	0,16	10,00	0,47	0,05
718 077 spät b	22	252	24,00	52,67	6,00	137,33	0,46	4,00	0,17	8,78	0,38	0,04
721 286 früh a	22	1152	323,33	363,33	17,33	1192,67	0,89	18,65	0,27	20,96	0,30	0,01
721 286 früh b	22	1152	238,00	290,00	18,00	910,67	0,82	13,22	0,26	16,11	0,32	0,02
460 226 früh a	23	540	19,33	125,33	10,67	216,00	0,15	1,81	0,09	11,75	0,58	0,05
460 226 früh b	23	540	15,33	108,67	12,00	177,33	0,14	1,28	0,09	9,06	0,61	0,07
718 087 früh a	23	328	18,00	86,67	11,33	172,67	0,21	1,59	0,10	7,65	0,50	0,07
718 087 früh b	23	328	15,33	74,00	9,33	178,00	0,21	1,64	0,09	7,93	0,42	0,05
721 286 spät a	23	4770	448,00	1136,67	61,33	2552,00	0,39	7,30	0,18	18,53	0,45	0,02
721 286 spät b	23	4770	480,00	1118,00	53,33	2554,00	0,43	9,00	0,19	20,96	0,44	0,02
460 256 spät a	24	274	147,33	435,33	90,00	1041,33	0,34	1,64	0,14	4,84	0,42	0,09
460 256 spät b	24	274	170,67	481,33	81,33	1110,67	0,35	2,10	0,15	5,92	0,43	0,07
718 087 spät a	24	435	41,33	74,67	14,67	218,00	0,55	2,82	0,19	5,09	0,34	0,07
718 087 spät b	24	435	40,00	69,33	15,33	202,67	0,58	2,61	0,20	4,52	0,34	0,08
460 266 spät a	25	252	264,67	103,33	18,00	570,00	2,56	14,70	0,46	5,74	0,18	0,03
460 266 spät b	25	252	222,00	84,00	18,67	473,33	2,64	11,89	0,47	4,50	0,18	0,04
718 097 früh a	25	257	19,33	72,67	12,00	154,00	0,27	1,61	0,13	6,06	0,47	0,08
718 097 früh b	25	257	16,00	70,67	10,67	151,33	0,23	1,50	0,11	6,63	0,47	0,07
721 296 früh a	25	705	60,00	362,00	21,33	600,00	0,17	2,81	0,10	16,97	0,60	0,04
721 296 früh b	25	705	57,33	334,67	20,67	561,33	0,17	2,77	0,10	16,19	0,60	0,04
460 276 früh a	26	139	98,67	64,00	24,67	287,33	1,54	4,00	0,34	2,59	0,22	0,09
460 276 früh b	26	139	87,33	60,67	16,00	254,00	1,44	5,46	0,34	3,79	0,24	0,06
718 097 spät a	26	468	57,33	146,67	19,33	351,33	0,39	2,97	0,16	7,59	0,42	0,06
718 097 spät b	26	468	51,33	154,00	22,00	384,67	0,33	2,33	0,13	7,00	0,40	0,06
460 276 spät a	27	184	140,67	86,00	11,33	333,33	1,64	12,41	0,42	7,59	0,26	0,03
460 276 spät b	27	184	110,00	68,67	6,67	256,67	1,60	16,50	0,43	10,30	0,27	0,03
460 286 früh a	28	149	362,00	118,67	17,33	658,00	3,05	20,88	0,55	6,85	0,18	0,03

460 286 früh b	28	149	201,33	71,33	10,00	408,67	2,82	20,13	0,49	7,13	0,17	0,02
718 107 spät a	28	329	13,33	66,00	10,67	156,67	0,20	1,25	0,09	6,19	0,42	0,07
718 107 spät b	28	329	27,33	78,00	9,33	207,33	0,35	2,93	0,13	8,36	0,38	0,05
460 296 früh a	29	164	25,33	50,67	6,00	119,33	0,50	4,22	0,21	8,44	0,42	0,05
460 296 früh b	29	164	19,33	60,00	10,00	125,33	0,32	1,93	0,15	6,00	0,48	0,08
721 296 spät a	29	1678	129,33	716,67	23,33	1109,33	0,18	5,54	0,12	30,71	0,65	0,02
721 296 spät b	29	1678	132,67	690,67	27,33	1120,00	0,19	4,85	0,12	25,27	0,62	0,02
460 296 spät a	31	168	32,67	57,33	5,33	126,00	0,57	6,12	0,26	10,75	0,46	0,04
460 296 spät b	31	168	16,00	37,33	1,33	76,67	0,43	12,00	0,21	28,00	0,49	0,02
721 306 früh a	31	3937	356,00	1622,67	160,00	3110,00	0,22	2,23	0,11	10,14	0,52	0,05
721 306 früh b	31	3937	420,67	1741,33	136,67	3358,67	0,24	3,08	0,13	12,74	0,52	0,04
460 306 früh a	32	77	10,00	16,67	0,67	40,67	0,60	15,00	0,25	25,00	0,41	0,02
460 306 früh b	32	77	15,33	21,33	2,00	49,33	0,72	7,67	0,31	10,67	0,43	0,04
460 306 spät a	33	165	53,33	53,33	10,67	158,67	1,00	5,00	0,34	5,00	0,34	0,07
460 306 spät b	33	165	44,67	44,67	12,00	150,00	1,00	3,72	0,30	3,72	0,30	0,08
721 306 spät a	33	1486	200,67	813,33	38,67	1502,00	0,25	5,19	0,13	21,03	0,54	0,03
721 306 spät b	33	1486	122,67	572,00	20,67	1008,67	0,21	5,94	0,12	27,68	0,57	0,02
532 146 spät a	34	3174	294,67	1042,67	166,67	2130,67	0,28	1,77	0,14	6,26	0,49	0,08
532 146 spät b	34	3174	266,00	972,00	138,00	1842,00	0,27	1,93	0,14	7,04	0,53	0,07
718 137 spät a	34	337	49,33	138,00	13,33	298,67	0,36	3,70	0,17	10,35	0,46	0,04
718 137 spät b	34	337	42,00	112,67	18,67	282,67	0,37	2,25	0,15	6,04	0,40	0,07
532 156 früh a	35	523	30,00	85,33	13,33	188,67	0,35	2,25	0,16	6,40	0,45	0,07
532 156 früh b	35	523	34,00	96,67	14,00	224,00	0,35	2,43	0,15	6,90	0,43	0,06
532 156 spät a	36	865	62,67	346,00	42,00	637,33	0,18	1,49	0,10	8,24	0,54	0,07
532 156 spät b	36	865	72,00	363,33	46,67	672,00	0,20	1,54	0,11	7,79	0,54	0,07
718 147 spät a	36	282	20,00	44,67	15,33	128,67	0,45	1,30	0,16	2,91	0,35	0,12
718 147 spät b	36	282	22,67	42,67	12,00	140,67	0,53	1,89	0,16	3,56	0,30	0,09
532 166 früh a	37	491	51,33	201,33	24,00	393,33	0,25	2,14	0,13	8,39	0,51	0,06
532 166 früh b	37	491	48,67	170,00	21,33	359,33	0,29	2,28	0,14	7,97	0,47	0,06
532 166 spät a	38	670	58,67	192,67	23,33	451,33	0,30	2,51	0,13	8,26	0,43	0,05
532 166 spät b	38	670	74,67	227,33	31,33	504,67	0,33	2,38	0,15	7,26	0,45	0,06
718 157 spät a	38	271	10,00	68,67	13,33	158,00	0,15	0,75	0,06	5,15	0,43	0,08
718 157 spät b	38	271	17,33	96,67	14,67	210,00	0,18	1,18	0,08	6,59	0,46	0,07
532 176 früh a	39	448	56,67	108,67	20,67	295,33	0,52	2,74	0,19	5,26	0,37	0,07
532 176 früh b	39	448	57,33	99,33	22,00	285,33	0,58	2,61	0,20	4,52	0,35	0,08
532 176 spät a	40	477	68,67	164,67	16,67	390,00	0,42	4,12	0,18	9,88	0,42	0,04
532 176 spät b	40	477	62,67	155,33	15,33	355,33	0,40	4,09	0,18	10,13	0,44	0,04
532 186 früh a	41	263	32,67	58,67	12,67	172,00	0,56	2,58	0,19	4,63	0,34	0,07
532 186 früh b	41	263	25,33	48,67	14,00	151,33	0,52	1,81	0,17	3,48	0,32	0,09
532 186 spät a	42	211	28,67	50,67	6,67	147,33	0,57	4,30	0,19	7,60	0,34	0,05
532 186 spät b	42	211	24,00	63,33	12,00	156,00	0,38	2,00	0,15	5,28	0,41	0,08
532 196 früh a	43	153	13,33	16,00	7,33	69,33	0,83	1,82	0,19	2,18	0,23	0,11
532 196 früh b	43	153	14,00	18,67	3,33	71,33	0,75	4,20	0,20	5,60	0,26	0,05
532 196 spät a	44	126	20,67	51,33	2,67	117,33	0,40	7,75	0,18	19,25	0,44	0,02
532 196 spät b	44	126	28,00	50,00	6,67	127,33	0,56	4,20	0,22	7,50	0,39	0,05

Nr.: Nummer der Melkung seit Feststellung der Mastitis

SCC Foss: somatische Zellzahl mittels Fossomatic™ 5000 bestimmt

Vorne, mitte, hinten: Lage des kritischen Bereichs der Zellgrößenverteilung

Q: Quotient

V: vorderer kritischer Bereich \triangleq vorne

M: mittlerer kritischer Bereich \triangleq mitte

H: hinterer kritischer Bereich \triangleq hinten

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig von mir verfasst wurde und keine anderen als die gekennzeichneten Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Diese Dissertation lag bisher weder in Teilen noch als Ganzes einem anderen Promotionsverfahren zugrunde.

Datum

Unterschrift

